

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

на правах рукописи

СЕНОТОВ АНАТОЛИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ПОВЫШЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА
К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ
В ТРЕХМЕРНЫХ КУЛЬТУРАХ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ**

1.5.22. – Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Фадеев Роман Сергеевич

Пушино 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Острый миелоидный лейкоз.....	10
1.1.1 Эпидемиология и факторы риска острого миелоидного лейкоза	10
1.1.2 Классификация острого миелоидного лейкоза	12
1.1.3 Прогностические факторы при острых миелоидных лейкозах.....	13
1.2 Цитокин TRAIL	17
1.2.1 TRAIL лиганд	17
1.2.2 TRAIL рецепторы.....	20
1.3 Цитотоксический сигнальный путь TRAIL.....	23
1.3.1 Каспазозависимый	23
1.3.2 Каспазозависимый путь.....	26
1.4 Альтернативные, нецитотоксические сигнальные пути TRAIL	29
1.4.1 Активация сигнального пути NF-κB.....	30
1.4.2 Активация митоген-активируемых протеинкиназ	31
1.4.2.1 c-Jun N-концевые киназы.....	32
1.4.2.2 p38 MAPK.....	33
1.4.2.3 Протеинкиназы регулируемые внеклеточным сигналом (ERK)	33
1.4.2.4 TGF-β - активируемая киназа 1	34
1.4.3 Протеинкиназа C	35
1.4.4 Фосфатидилинозитол-3-киназы.....	36
1.4.5 С-терминальная Src протеинкиназа	39
1.5 Применение TRAIL как терапевтического препарата.....	40
1.5.1 Рекомбинантный человеческий TRAIL	40
1.5.2 TRAIL-производные	41

1.5.3 TRAIL-конъюгаты, слитые белки и генно-инженерные модификации	42
1.5.4 Агонистические антитела TRAIL-R.....	43
1.5.4.1 Агонистические антитела TRAIL-R1	44
1.5.4.2 Агонистические антитела TRAIL-R2.....	44
1.5.4.3 Новые поливалентные антитела	45
1.5.5 Комбинированные стратегии	46
1.6 Возможные причины формирования резистентности к TRAIL.....	47
1.6.1 Нарушение передачи сигналов через рецепторы	48
1.6.1.1 Интернализация рецепторов.....	48
1.6.1.2 Влияние гликозилирования рецепторов на устойчивость к TRAIL.....	49
1.6.2 Влияние cFLIP	51
1.6.3 Ингибирование функции каспаз.....	52
1.6.4 Нарушение баланса Vcl-2 белков	54
1.6.5 Фактор транскрипции гена гомеобокса	55
1.7 Возможные условия формирования резистентности к TRAIL	56
1.7.1 Генетическая гетерогенность.....	56
1.7.2 Влияние микроокружения.....	56
1.7.3 «Опухолевая среда» организма	57
1.7.4 Влияние воспаления.....	58
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
2.1 Реактивы.....	60
2.2 Культуры клеток и условия культивирования	60
2.3 Оценка цитотоксического действия белка izTRAIL.....	61
2.4 Анализ ферментативной активности каспаз 3/7	61
2.5 Вестерн-блот анализ.....	62
2.6 Анализ представленности рецепторов к TRAIL на поверхности клеток.....	63

2.7 Секвенирование транскриптомов.....	64
2.8 Компьютерные методы обработки первичных данных транскриптомов.	64
2.9 Биоинформатический анализ транскриптомов	65
2.10 Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени.....	66
2.11 Статистический анализ	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1 Повышение устойчивости клеток миелоидного лейкоза ТНР-1 к TRAIL-индуцированной гибели в высокоплотных культурах.....	67
3.2 Биоинформатический анализ транскриптома клеток ОМЛ ТНР-1 в трехмерных культурах высокой и низкой плотности.	72
3.3 Сравнительный анализ сигнального пути TRAIL в клетках высокоплотных и низкоплотных культур.....	78
3.4 Анализ внутриклеточных ингибиторов апоптоза у клеток ТНР-1 в трехмерных культурах высокой плотности	83
3.5 Оценка возможности подавления устойчивости клеток миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели в высокоплотных культурах.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
ВЫВОДЫ	91
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	92
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	94

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Согласно медицинской статистике, острые миелоидные лейкозы занимают второе место в структуре онкологических заболеваний и составляют 25% из всех злокачественных новообразований у детей. Для лечения острых миелобластных лейкозов (ОМЛ) характерна низкая эффективность. Согласно статистике, 15-30% пациентов не достигают ремиссии после индукционной терапии по причине первичной устойчивости к лечению. Также, у более чем 60% пациентов с достигнутым ответом в течение первых трех лет развивается рецидив после формирования приобретенной лекарственной устойчивости (Клинические рекомендации ОМЛ, 2020). Первичную устойчивость лейкозных клеток часто связывают с ограничением их пролиферации (Zhang, Gu, Chen, 2019). Приобретенную устойчивость связывают с мутагенезом и клональной эволюцией, когда изначально чувствительные клетки постепенно становятся устойчивыми к терапии (Ding et al., 2012). Последнее десятилетие, исследователи обращают внимание на влияние микроокружения лейкозных клеток в костном мозге на их лекарственную устойчивость (Behrmann, Wellbrock, Fiedler, 2018; Maman, Witz, 2018). Этот интерес связан с тем, что применение противоопухолевых препаратов является эффективным только для лейкозных клеток, вышедших из костного мозга в периферическое русло, а локализованные в костном мозге лейкозные клетки остаются устойчивыми к противоопухолевой терапии, что определяет рецидив заболевания. Формирование такого рода лекарственной устойчивости лейкозных клеток, происходит при повышении их концентрации в ограниченном пространстве костного мозга (КМ), что приводит к формированию уникального околочелочного микроокружения, включающего как клеточный компонент, так и внеклеточный матрикс (Li et al., 2019; Binder, Luciano, Norejs-Ноеск, 2018). Учитывая вышесказанное, актуальным направлением исследований является изучение механизмов повышения устойчивости опухолевых клеток к повреждающим воздействиям в высокоплотных культурах, моделирующих участки опухолей *in vivo*. При этом, интерес вызывает повышение резистентности клеток не только к

химиотерапевтическим препаратам, но и к медиаторам иммунного надзора, в частности, к цитокину TRAIL (TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand).

Цитокин TRAIL уникален тем, что селективно вызывает рецептор-опосредованную апоптозную гибель опухолевых клеток и не повреждает здоровые клетки организма (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999; Wiley et al., 1995). Эти свойства белка TRAIL привлекли к нему внимание как к потенциальному противоопухолевому препарату с уникальной избирательностью по отношению к опухолевым клеткам. Однако оказалось, что не все опухолевые клетки могут быть чувствительны к TRAIL (Deng, Shah, 2020). Более того, было обнаружено, что TRAIL-чувствительные клетки карцином и сарком, полученные из солидных опухолей человека, способны приобретать обратимую TRAIL-резистентность в высокоплотных конфлюэнтных (двумерных) культурах (Fadeev et al., 2012; Yokokura et al., 2016) и в трехмерных (клеточных сфероидах) *in vitro* (Barbone et al., 2008; Grayson et al., 2021). Также в литературе отсутствуют данные о возможности повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в схожих условиях. С учетом того, что клетки ОМЛ не зависят от прикрепления и культивируются в суспензии, в отличие от клеток солидных опухолей, нами была предложена простая трехмерная *in vitro* модель, имитирующая накопление лейкозных клеток в ограниченном пространстве КМ – стационарные высокоплотные культуры, культивируемые без смены питательной среды. В данной модели впервые показана принципиальная возможность повышения устойчивости клеток ОМЛ как к действию химиотерапевтических препаратов, так и к цитотоксическому действию rhTRAIL (Захаров и др., 2014; Фадеев, 2012; Фадеев и др., 2015), однако остается неясным, насколько этот феномен является общим для различных типов клеток ОМЛ и каков его механизм. Работы в этом направлении представляют фундаментальный интерес и практическую значимость.

В данной работе представлены результаты исследования механизмов повышения устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели в высокоплотных культурах, имитирующих накопление лейкозных клеток в ограниченном пространстве костного мозга.

Целью работы является изучение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности *in vitro*.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследование изменения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности.
2. Исследование механизмов повышения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности.
3. Оценка возможности подавления повышенной резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности.

Научная новизна. В работе впервые показано возникновение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL – индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности. Этот феномен обратим и не связан с ограничением проникновения белка TRAIL к клеткам. Впервые установлено, что повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности основано на TNF-регулируемом и NF- κ B опосредованном увеличении экспрессии антиапоптотических белков семейств IAP и BCL-2. Показана принципиальная возможность подавления резистентности клеток ОМЛ к TRAIL – индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности с помощью ВНЗ миметика Navitoclax.

Теоретическая и практическая значимость. Показана возможность подавления резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности, при использовании ВНЗ миметика Navitoclax. Данные результаты имеют значение для разработки новых подходов в иммунотерапии ОМЛ.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационного исследования выступают методы аналогии и моделирования, используемые для научного познания процессов и явлений, происходящих в организме человека.

Для решения поставленных задач и достижения цели исследования в ходе работы были использованы методы биофизики и клеточной биологии, такие как проточная цитометрия, спектрофото- и флуорометрия, вестерн-блоттинг, секвенирование РНК, методы биоинформатического анализа. Работа выполнена с использованием постоянных клеточных линий острого миелоидного лейкоза человека, формирующих культуры высокой плотности, что позволяет создать предметную (материальную) модель паталогического состояния лейкозных бластов в костном мозге.

Положения, выносимые на защиту:

1. У клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности происходит повышение резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу.
2. Повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах является обратимым и не связано с ограничением проникновения цитотоксического белка к клеткам.
3. Повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах регулируется TNF-NF- κ B зависимым повышением экспрессии антиапоптотических белков семейств IAP и BCL-2.
4. Резистентность клеток ОМЛ к TRAIL- индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах эффективно подавляется применением ВНЗ миметика Navitoclax.

Достоверность полученных результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена репрезентативным количеством материала, глубокой проработкой темы и методов исследования. Эксперименты проводились на современном сертифицированном оборудовании. Обработка данных и подтверждение достоверности полученных результатов проводилась с использованием современных статистических методов и программ. Полученные в ходе работы результаты соответствуют данным, представленным в научной литературе, и соответственно интерпретируются.

Апробация. Основные материалы диссертационной работы доложены на V Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 16-18 декабря 2019 года), 19-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, Россия, 20-24 апреля 2015 г.), Abs. European Leukemia Net (ELN) Frontiers Meeting (Berlin, Germany, 16-19 October 2014), EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour–microenvironment crosstalk» (Tomsk, Russia, 9-12 July 2015), 1-й Международной конференции для молодых ученых «Mitochondrial pores and channels as pharmacological targets» (Пушино, Россия, 29-30 октября 2014 г.).

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором лично. Постановка научной проблемы и формулировка рабочей гипотезы, планирование эксперимента, анализ и интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научными руководителями. Поиск и анализ литературы по теме диссертации, экспериментальные исследования и статистическая обработка первичных данных, написание и оформление диссертации выполнено автором самостоятельно. Результаты исследования в виде публикаций в научных периодических изданиях и докладов на конференциях представлены совместно с соавторами.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Острый миелоидный лейкоз

Острый миелоидный лейкоз представляет собой гетерогенную группу злокачественных новообразований из предшественников с клеток миелоидных, эритроидных, мегакариоцитарных и моноцитарных линий. Эти лейкозы, как и другие злокачественные новообразования, связаны с генетическими вариациями, которые приводят к неопластическим изменениям и клональной трансформации гемопоэтических предшественников (Pelcovits, Niroula, 2020; Rubnitz, Gibson, Smith, 2010).

1.1.1 Эпидемиология и факторы риска острого миелоидного лейкоза

Согласно общепринятому мнению, заболеваемость ОМЛ составляет 3–5 человек на 100 тысяч населения в год. Заболеваемость также имеет корреляцию с возрастом и резко возрастает у людей старше 60 лет и составляет 12–13 случаев на 100 тыс. населения у лиц в возрасте старше 80 лет. Медиана возраста заболевания для ОМЛ составляет 65 лет. Среди детского населения России эпидемиология ОМЛ изучена недостаточно, но согласно существующей статистике, каждый пятый случай острого лейкоза у детей это ОМЛ и в структуре всех опухолей у детей составляет 6%, с максимальной встречаемостью в возрасте 2 года и снижением к минимуму заболеваемости к 9 годам (Rubnitz, Gibson, Smith, 2010). Ежегодно регистрируется 0,7-1,2 новых случаев на 100 тысяч детей (Национальное общество детских гематологов и онкологов, 2020).

Согласно прогноза Европейских и Американских исследователей, при общей численности населения России 140 млн жителей расчетный показатель заболеваемости должен составлять около 5 тыс. заболевших (Shallis et al., 2019). Но регистрационное исследование, выполненное российской исследовательской группой в части регионов России, показало, что медиана возраста диагностики ОМЛ составляет 53 года, что на 12 лет меньше. Эти результаты могут говорить, как о недостаточной диагностике ОМЛ у возрастных пациентов, так и о меньшей

продолжительности жизни в стране. Заболеваемость, согласно данным исследования, составила 1,32 случая на 100 тыс. взрослого населения (Паровичникова, 2012; Савченко, Паровичникова, 2007).

Существует несколько факторов, значительно увеличивающих риск развития ОМЛ. Доказана связь между повышенным риском развития заболевания и факторами внешней среды, ионизирующей радиацией после применения ядерного оружия, химио- и радиотерапией других опухолей. Установлена дозовая зависимость развития ОМЛ с курением, особенно очевидная после 60 лет. Существует мнение, что 20% заболеваний ОМЛ связано с курением. Длительное воздействие нефтепродуктов, органических растворителей (бензола), гербициды и пестициды (органофосфаты) также приводит к лейкемогенному эффекту (Korte et al., 2000; McBride, 1998; Mills, Zahm, 2001; Snyder, 2012; Yin et al., 1996a, 1996b). Особое внимание привлекает высокий риск развития вторичных ОМЛ в результате предшествующего воздействия химиотерапии и облучения. Высока вероятность развития этого до 85%, в период от 2 до 9 лет после завершения предшествующей химиотерапии интеркалирующими ингибиторами топоизомеразы II (этопозид) и алкилирующими агентами (циклофосфамид, азотистый иприт, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил) (Паровичникова, 2012; Савченко, Паровичникова, 2007; Le Deley et al., 2003; Linassier et al., 2000; Micallef et al., 2000; Sandoval et al., 1993). Для детей с первичными ОМЛ специфические факторы окружающей среды не идентифицируются, но существует большое количество наследственных заболеваний, предрасполагающих к развитию заболевания. Среди них синдром Дауна, анемия Фанкони, синдром Костмана, синдром Швахмана-Даймонда, синдром Даймонда-Блэкфана, нейрофиброматоз 1 типа, синдром Нунана, врожденный дискератоз, семейное заболевание тромбоцитов с предрасположенностью к ОМЛ, врожденной генитальной амегариоцитарной тромбоцитопении, атаксии-телеангиэктазии, синдрома Клайнфельтера, синдрома Ли-Фраумени и синдрома Блума (Bader-Meunier et al., 1997; Rosenberg, Greene, Alter, 2003).

Также, ОМЛ связан с несколькими приобретенными состояниями, включая апластическую анемию, миелодиспластический синдром, приобретенную

амегакариоцитарную тромбоцитопению и пароксизмальную ночную гемоглобинурию (Imashuku et al., 1994; Socie et al., 1993; Xue et al., 1993).

1.1.2 Классификация острого миелоидного лейкоза

Первой общепринятой классификацией острых лейкозов, основанной на морфологических и цитохимических признаках, была утвержденная в 1976 году франко-американо-британская (FAB) классификация (Bennett et al., 1976). На протяжении использования FAB активно дополнялась в 1981, 1985 и 1987 годах, в своем пересмотренном варианте широко применяется в настоящее время. По мере появления новых, объективных методов диагностики потребовался кардинальный ее пересмотр. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 2016 году утвердила новую редакцию классификации ОМЛ, которая основана на цитогенетических и молекулярно-генетических особенностях, из них сформированы клинико-патологические группы (Arber et al., 2016) (таблица 1).

Таблица 1 – классификация ОМЛ по ВОЗ, 2016 г.

• ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями:
ОМЛ с t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
ОМЛ с inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
Острый промиелоцитарный лейкоз с t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
ОМЛ с t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
ОМЛ с t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
ОМЛ с inv(3)(q21q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i>
ОМЛ (мегакариобластный) с t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
ОМЛ с <i>BCR/ABL1</i>
• ОМЛ с генными мутациями:
ОМЛ с мутированным геном <i>NPM1</i>
ОМЛ с биаллельной мутацией гена <i>CEBPA</i>
ОМЛ с мутированным геном <i>RUNX1</i>
• ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией
• Миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей ХТ
• ОМЛ, по-другому не специфицированные (NOS)
Острый миелобластный лейкоз с минимальной дифференцировкой
Острый миелобластный лейкоз без созревания
Острый миелобластный лейкоз с созреванием
Острый миеломонобластный лейкоз
Острый монобластный/моноцитарный лейкоз
Острый эритромиелоз
Острый мегакариобластный лейкоз

Острый лейкоз из базофилов
Острый панмиелоз с миелофиброзом (синоним: острый миелофиброз, острый миелосклероз)
• Миелоидная саркома (синоним: экстрамедуллярная миелоидная опухоль, гранулоцитарная саркома, хлорома)
• Миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна
Транзиторный аномальный миелопоэз (синоним: транзиторное миелопролиферативное заболевание (МПЗ))
Миелоидный лейкоз, связанный с синдромом Дауна
• Опухоль из плазмацитоидных дендритных клеток
• Острые лейкозы неопределенной линии дифференцировки
Острый недифференцированный лейкоз
Острый лейкоз смешанного фенотипа (ОЛСФ) с t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
ОЛСФ с t(v;11q23.3); реаранжировка гена <i>KMT2A</i> (ранее – <i>MLL</i>)
ОЛСФ, В/миелоидный, NOS
ОЛСФ, Т/миелоидный, NOS
ОЛСФ NOS
ОЛ неопределенной линии дифференцировки NOS.

Согласно текущей классификации, диагноз ОМЛ устанавливают при обнаружении в костном мозге 20% бластных клеток и более, при этом миелоидные опухоли, возникшие вследствие ранее проводимой ХТ по поводу других заболеваний, в отдельную форму ОМЛ не выделяются. Современные рекомендации международной группы экспертов по диагностике и лечению острого миелоидного лейкоза (ELN2022) расширяют и детализируют классификацию, снижая порог бластных клеток в костном мозге и периферической крови необходимый для установления диагноза до 10%. Предшествующие заболеванию химио- и лучевую терапии, иммунные вмешательства, а также прогресс миелодиспластического синдрома и миелопролиферативного заболевания выведены в отдельную форму, также важным следует отметить рекомендации по созданию биобанка опухолевых клеток пациентов (Döhner et al., 2022).

1.1.3 Прогностические факторы при острых миелоидных лейкозах

Факторы, влияющие на терапию ОМЛ можно разделить на 3 группы:

1. Особенность заболевания – характеристики, определяемые при обследовании первично выявленного лейкоза, наличие в анамнезе

миелопролиферативного заболевания, миелодиспластического синдрома, химио-, лучевой или иммунотерапии.

2. Особенности пациента – половозрастные характеристики, наличие других заболеваний.
3. Эффективность терапии – сроки достижения ремиссии, наличие минимальной остаточной болезни (МОБ).
4. Факторы связанные с неадекватной химиотерапией.

1. Особенности заболевания

Согласно классификации ELN2017, основывающейся на результатах наблюдения за влиянием изученных молекулярно-генетических аномалий на течение и исход ОМЛ, все пациенты разделены на 3 прогностические группы риска ELN2017, благоприятную (10-20%), промежуточную (40-50%) и неблагоприятную (30-40%) (Döhner et al., 2017). Классификация ELN2022 основываясь на накопленных с 2017 года данных внесла корректировки для определения группы риска. В дополнение к базовой генетической характеристике, при расчете индивидуальной группы риска, ELN2022 учитывает ответ на начальную терапию и оценку ранней минимальной остаточной болезни (МОБ). Например, в клинической практике пациент из группы риска с благоприятным течением, на основании наличия либо отсутствия МОБ, может быть перемещен в промежуточную группу риска и наоборот. Критерии классификации риска по генетике указаны в таблице 2.

Таблица 2. Европейская классификация риска ELN2022 по генетике на начальном этапе диагноза.

Категория риска	Генетическая аномалия
Благоприятный	• $t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1$
	• $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$
	• Мутированный <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i>
	• bZIP мутация внутри рамки <i>CEBPA</i>
Средний	• Мутированный <i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i>
	• <i>NPM1</i> дикого типа с <i>FLT3-ITD</i>
	• $t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A$

	<ul style="list-style-type: none"> • Цитогенетические и/или молекулярные аномалии, не классифицируемые как благоприятные или неблагоприятные
Неблагоприятный	• t(6;9)(p23;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i>
	• t(v;11 q23.3)/ <i>KMT2A</i> -перестроенная
	• t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i>
	• t(8;16)(p11;p13)/ <i>KAT6A::CREBBP</i>
	• inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EV11)</i>
	• t(3q26.2;v)/ <i>MECOM(EW1)</i> -перестроенная
	• -5 или del(5q); -7; -17/abn(17p)
	• Сложный кариотип, моносомальный кариотип
	• Мутированный <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> или <i>ZRSR2</i>
	• Мутированный <i>TP53</i>

2. Индивидуальные характеристики пациента

Основным фактором, влияющим на результаты лечения, остается возраст пациента. Доля пациентов в неблагоприятной группе риска в возрасте до 56 лет составляла 33%, возрастая до 38-39% в возрасте 56-75 лет и до 50% после 75 лет (Appelbaum et al., 2006). На смертность влияет наличие сопутствующих заболеваний, количество которых также увеличивается с возрастом. Достоверно увеличивалась смертность пациентов с сопутствующими заболеваниями и получающих индукционную терапию (Sorrer et al., 2017).

3. Эффективность терапии

Основным критерием эффективности терапии ОМЛ длительное время считалось достижение полной морфологической ремиссии, которое оценивалось по количеству бластных клеток менее 5% в костном мозге (КМ). Морфологическое исследование, методом цитологии очень субъективно, как следствие имеет значительную вариабельность и низкую чувствительность (Zhou et al., 2017), но статистически, пациенты достигшие морфологической ремиссии жили дольше. В настоящее время, для точной оценки и мониторинга МОБ широко распространены в клинической практике методы основанные на

многопараметрической проточной цитометрии (МПЦ) и количественные молекулярные методы, основанные на полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-qPCR) (Dillon et al., 2021). К новым исследовательским технологиям относятся секвенирование нового поколения (NGS) и цифровая ПЦР (dPCR) (Vonk et al., 2021). Основные характеристики перечисленных методов и технологий перечислены в таблице 3.

Таблица 3. Методы выявления МОБ при ОМЛ.

Метод	Цель	Чувствительность	Применимо в % от ОМЛ	Срок выполнения (дни)	Ограничения/проблемы
МПЦ	Имунофенотип, ассоциированный с лейкозом, или отличный от нормального	от 10^{-3} до 10^{-4}	85-90	2	Менее чувствительный, более субъективный анализ
RT-qPCR	Надежные данные: <i>NPM1</i> , <i>CBFB :: MYH11</i> , <i>RUNX1 :: RUNX1T1</i> Менее проверенные: <i>KMT2A :: MLLT3</i> , <i>DEK :: NUP214</i> , <i>BCR :: ABL1, WT1</i>	от 10^{-4} до 10^{-5}	40-50	3-5	Ограниченная применимость
NGS	Потенциально любая соматическая мутация	от 10^{-2} до 10^{-4}	~100	5-10	Менее чувствительный, дорогой, технически сложный

Метод	Цель	Чувствительность	Применимо в % от ОМЛ	Срок выполнения (дни)	Ограничения/проблемы
dPCR	Специфические целевые мутации	от 10^{-3} до 10^{-4}	~70	3-5	Для каждой мутации необходим специфический анализ, ограниченная чувствительность

4. Факторы связанные с неадекватной химиотерапией

Согласно мнению экспертов Общероссийского национального союза «Ассоциация онкологов России», для нашей страны, к сожалению, как фактор неблагоприятного прогноза существует неадекватное цитостатическое воздействие на стадии индукционной или консолидационной терапии связанное с неправильным расчетом доз цитостатических препаратов, удлинением интервалов между курсами или неадекватная предлеченность. Так, еще в 70-х годах прошлого века американскими исследователями было доказано, что программа «5+2» статистически хуже, чем программа «7+3». Российскими исследователями было доказано, что уменьшение доз цитарабина и антрациклинов в программе «7+3» существенно снижает показатели выживаемости (Савченко, Паровичникова, 2007).

1.2 Цитокин TRAIL

1.2.1 TRAIL лиганд

Цитокин TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand, CD253, APO2-L, TRAIL/Apo2L) принадлежащий к суперсемейству TNF был открыт в 1995 году на основе гомологии его внеклеточного домена с другими членами суперсемейства, таких как FasL и TNF- α , первоначально был описан как Fas-независимый

индуктор апоптоза (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Различные клетки иммунной системы, в том числе эозинофильные гранулоциты, макрофаги, нейтрофильные гранулоциты, дендритные клетки, моноциты, натуральные киллеры (NK), Т- и В-клетки, экспрессируют TRAIL на своей поверхности, также хорошо известно, что TRAIL играет важную роль в иммунном надзоре за опухолью (Alizadeh Zeinabad, Szegezdi, 2022). Кодирован геном TNFSF10, расположенным на третьей хромосоме человека в положении 3q26 (Wang et al., 2000). По структуре TRAIL представляет собой трансмембранный белок II типа и состоит из короткого N-концевого цитоплазматического домена, трансмембранной спирали, внеклеточного стебля или «ножки» и TNF-подобного внеклеточного C-концевого рецептор-связывающего домена, имеющего высокую гомологию с другими членами суперсемейства TNF (Cha et al., 1999; Hymowitz et al., 1999; Manzo et al., 2009). Мономер состоит из двух антипараллельных β -складчатых листов полипептидного фрагмента длиной в 281 аминокислотный остаток с прогнозируемой молекулярной массой около 32,509 кДа, который в своей зрелой, гликозилированной форме имеет молекулярную массу 41 кДа. Внеклеточная «ножка» представляет собой сайт расщепления в аминокислотном положении 114, которое высвобождает растворимый фрагмент молекулярной массой около 24 кДа (Pitti et al., 1996). Кристаллическая структура TRAIL имеет петлю, состоящую из 12-16 аминокислот, функция которой заключается во взаимодействии с рецептором, что имеет основное значение для цитотоксической активности (Cha et al., 1999).

Аналогично другим представителям суперсемейства TNF, TRAIL образует гомотример (Рисунок 1а), но является единственным лигандом, содержащим остаток цистеина в положении 230, который позволяет его стабилизировать его тримерную форму посредством образования сульфидных связей между аминокислотными остатками цистеина, координирующим центром при этом выступает ион цинка (Bodmer et al., 2000; Hymowitz et al., 2000) (Рисунок 1б). Экспериментальным путем было доказано, что замена цистеина в положении 230 на серин или аланин, равно как и удаление иона цинка, уменьшает тримеризацию, а получающиеся мономерные и димерные формы TRAIL становятся неактивными

(Bodmer et al., 2000). При этом следует отметить, что только в виде тримерной формы TRAIL может реализовать свой функционал, связанный инициацией апоптотического сигнала. Связывание тримерного лиганда с рецепторами клеточной гибели приводит к образованию комплекса «тримерный лиганд – тримеризованный рецептор», способного инициировать апоптоз (Almasan, Ashkenazi, 2003) (рисунок 1в,г). Таким образом, стабильность тримерной структуры лиганда TRAIL играет решающую роль в его биологической функции (Ashkenazi, Holland, Eckhardt, 2008).

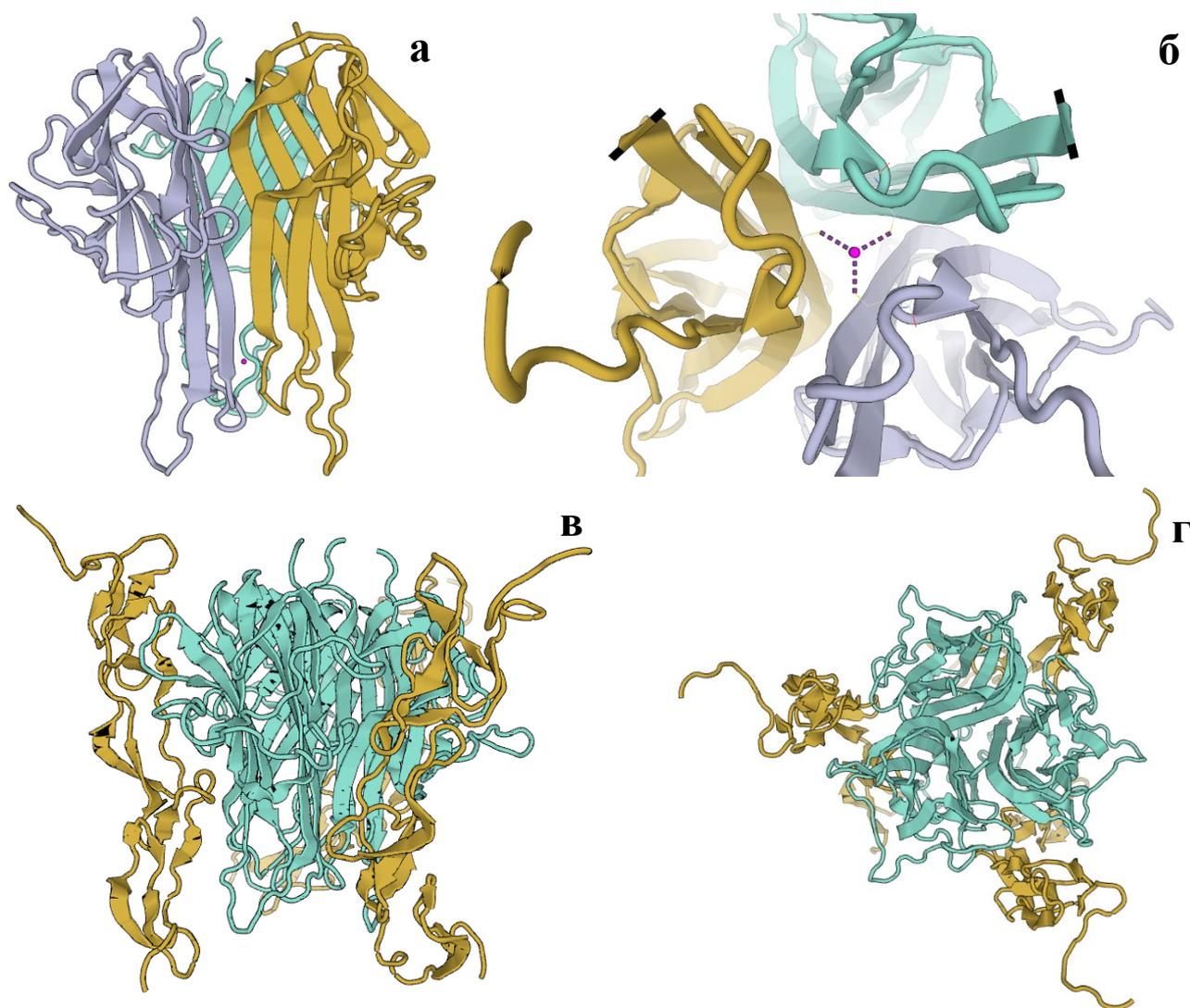


Рисунок 1. Тримерная структура лиганда TRAIL, каждый мономер обозначен своим цветом, вид сбоку (а), координирующий положение мономеров ион Zn^{2+} вид сверху (б). Комплекс «тримерный лиганд – тримеризованный рецептор» вид сбоку (в), вид сверху (г).

Учитывая важную роль в иммунном надзоре, возможность существования в растворимой форме, а также тот факт, что цитотоксические эффекты направлены только на трансформированные клетки, не оказывая влияние на нормальные, TRAIL оказался привлекательным объектом для терапии онкологических заболеваний в клинической практике. Первым протестированным для лечения рака растворимым рекомбинантным человеческим TRAIL (rhTRAIL) препаратом, содержащим внеклеточную часть (аминокислоты 114-281) был Dulanermin (Herbst et al., 2010). Хотя rhTRAIL имел очень хороший профиль безопасности и низкую токсичность, но показал низкую эффективность, связанную с коротким периодом полураспада, недостаточным накоплением в тканях и устойчивостью опухолевых клеток.

Чтобы преодолеть эти ограничения, за последние десятилетия были реализованы новые подходы для повышения эффективности. Период полувыведения растворимого rhTRAIL из организма составляет 0,56-1,02 часа (Herbst et al., 2010). Основной причиной быстрого снижения концентрации rhTRAIL был его относительно небольшой размер 60 кДа и основной механизм выведения был связан с почечной фильтрацией, отсечка которой составляет 70 кДа (Caliceti, 2003). Чтобы решить эту проблему, были разработаны многочисленные рекомбинантные производные TRAIL, которые помимо увеличения размера путем слияния с пептидом или белком, повышали его транспорт через эндотелий в ткани (Li et al., 2016; Seifert et al., 2014).

Хотя растворимая форма TRAIL является биологически активной, но было показано, что мембраносвязанная форма является в 100-1000 раз более мощным индуктором гибели клеток (von Karstedt, Montinaro, Walczak, 2017; Naval et al., 2019). Для решения этой проблемы использовали различные наноносители, включая органические и неорганические наночастицы, вирусные наночастицы и клетки (De Miguel et al., 2016; He, Zhang, Feng, 2020; Wang et al., 2016).

1.2.2 TRAIL рецепторы

TRAIL может связываться с четырьмя мембраносвязанными рецепторами: DR4/TRAIL-R1, DR5/ TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3 и DcR2/TRAIL-R4. Также

описан растворимый рецептор остеопротегерин, являющийся секретлируемым рецептором-ловушкой обнаруживаемым в системном кровотоке (Emery et al., 1998), который может выступать растворимым рецептором для лиганда активатора рецептора NF-κB (RANKL) (Simonet et al., 1997).

TRAIL-R3 и TRAIL-R4 имеют высокую идентичность внеклеточных доменов с рецепторами смерти, но не имеют функциональных цитоплазматических доменов смерти и действуют как рецепторы ловушки ингибируя индукцию апоптоза конкурентно связывая лиганды (Morizot et al., 2011; Mérimo et al., 2006). TRAIL-R3 представлен гликозилфосфатидилинозитол заякоренный в плазматической мембране и не имеет внутриклеточного домена. TRAIL-R4 содержит укороченный домен смерти и при гиперэкспрессии на мембране может индуцировать активацию NF-κB (Degli-Esposti et al., 1997). Однако физиологическая роль DcR1 и DcR2 до конца не изучена, и функция может зависеть от типа клеток.

Агонистические рецепторы клеточной гибели TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5 представляют собой трансмембранные белки I типа. Кодированы генами TNFSRF10B и TNFSFR10D расположенных в 8q21-22 хромосоме. Структурно состоят из внеклеточной области, включающей в себя несколько обогащенных цистеином доменов и отвечающей за связывание с лигандом, одним трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом, содержащим домен смерти (DD). Домены смерти представляют собой модули гомотипического взаимодействия белков, состоящие из 80 аминокислотных остатков, собранных в пучок из 6 альфа-спиралей, отвечающих за трансдукцию апоптотического сигнала как сайты связывания для адапторных белков (Sprick et al., 2000).

DR4 и DR5 на 58% сходны в последовательности, основное молекулярное различие заключается в том, что для DR4 существует один вариант сплайсинга, а DR5 имеет два варианта и, следовательно, 2 изоформы (Wang, Jeng, 2000). Длинная изоформа содержит 29 дополнительных аминокислот во внеклеточном домене, богатых треонином, аланином, пролином и глутамином, названных TAPE-доменом (Schneider et al., 1997). Впоследствии, рецепторы к TRAIL подвергаются посттрансляционной модификации, заключающейся в O-

гликозилировании, это повышает чувствительность к лиганду, стимулируя кластеризацию. После связывания с тримерным лигандом, DR4 и DR5 могут образовывать как гомо-, так и гетеротримерные комплексы, индуцирующие апоптоз. Эти лиганд-рецепторные комплексы более высокого порядка включают тримеризацию между соседними тримерами с образованием гексамерной сотовой структуры (Graves et al., 2014; Tuthill et al., 2015; Valley et al., 2012). Аналогично другим членам семейства TNF, рецепторы TRAIL располагаются на поверхности клетки в виде предварительно собранных олигомерных комплексов с образованием гомотримеров (Chan, 2007; Clancy et al., 2005). Образование комплексов происходит в результате взаимодействия доменов сборки предлиганда – богатых цистеином внеклеточных доменов (Clancy et al., 2005). Следовательно, повышение проапоптотической активности лиганда TRAIL связано с олигомеризацией рецепторов в супрамолекулярные структуры (Chan, 2007).

1.3 Цитотоксический сигнальный путь TRAIL

1.3.1 Каспазозависимый путь

После связывания тримеризованного лиганда TRAIL со своими предварительно олигомеризованными рецепторами TRAIL-R1 и TRAIL-R2, происходит их конформационное изменение на поверхности клетки. В результате этих изменений внутриклеточный домен смерти тримеризованного рецептора претерпевает пространственные перестройки, что приводит к рекрутированию адаптерных белков содержащих домен смерти, схема и основные участники представлены на рисунке 2. Для TRAIL-R1, TRAIL-R2 и Fas таким адаптерным белком является Fas-ассоциированный домен смерти (FADD) (Chinnaiyan et al., 1995; Sprick et al., 2000). Молекулы адаптерного белка способны связываться с рецепторами посредством гомотипического взаимодействия их доменов смерти. Также они содержат дополнительные модули межбелковых взаимодействий, такие как эффекторные домены смерти, которые обеспечивают рекрутирование инициаторных каспаз и cFLIP. Полученный в результате такой сборки комплекс получил название смерти индуцирующего сигнального комплекса (DISC), он может генерировать сигнальный каскад TRAIL-индуцированной гибели, иницируемый после активации каспаз-8 и -10. В настоящее время рассматривается три варианта активации инициаторных каспаз. Согласно первой гипотезе, получившей название индуцированной близости, считается что кластеризация каспаз на DISC приводит к их аутокатализу (Salvesen, Dixit, 1999). Вторая модель, индуцированной конформации, согласно которой активация инициаторных каспаз происходит за счет конформационных изменений их активного сайта после взаимодействия с адаптерным белком (Chao et al., 2005). Третья модель, которая является основной – димеризации, предполагает, что накопление инициаторных каспаз на DISC приводит сначала к их димеризации через тандемные эффекторные домены смерти, а затем каспазные домены выстраиваясь антипараллельно создают два каталитически активных сайта (Chang, 2003; Shi, 2004). После этого процессинг происходит в два этапа, первым идет междимерное ращепление между двумя проксимальными димерами с

образованием двух фрагментов, p43/41 и p12. Вторая стадия, внутримерное расщепление, в результате которого в цитозоль высвобождается активная гетеротетрамерная форма фермента, включающая по две большие p18 и малые p10 субъединицы с двумя активными сайтами, что, в свою очередь, запускает протеолитический каскад (Kallenberger et al., 2014; Shi, 2002).

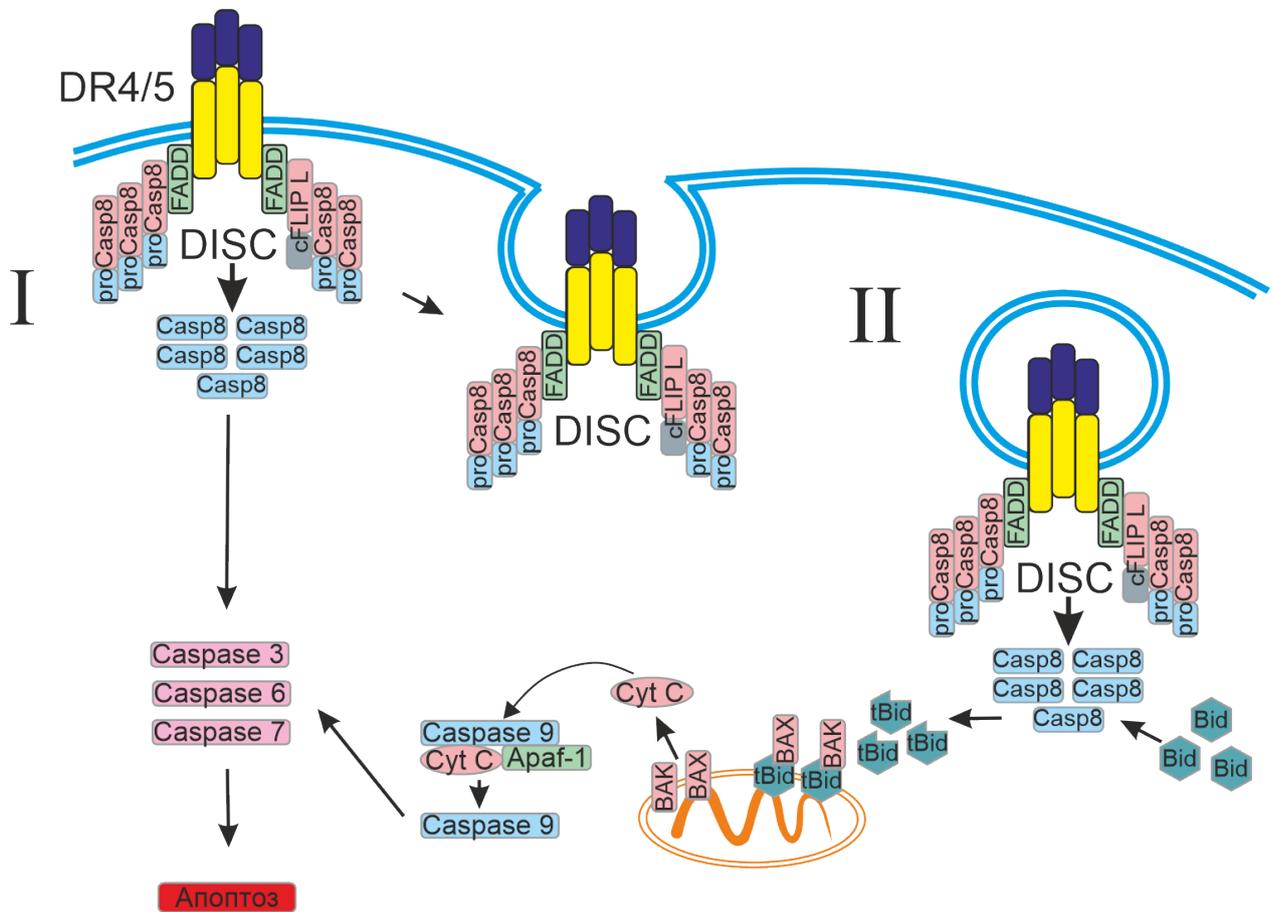


Рисунок 2. Каспазозависимые пути TRAIL-индуцированной гибели. I – путь, при котором субстратом для активной каспазы-8 выступают эффекторные каспазы-3, -6, -7. II – субстратом каспазы-8 выступает Bid, белок семейства Bcl-2. Иллюстративный материал к пп. 1.3.1

Процесс аутопротеолитической активации инициаторных каспаз-8 и -10 на DISC может регулироваться cFLIP (Smyth et al., 2020; Tschopp, Irmeler, Thome, 1998). В клетках, альтернативным сплайсингом мРНК, генерируется несколько вариантов cFLIP, но на уровне белка экспрессируется только три изоформы. Наиболее распространенным вариантом является длинная изоформа cFLIP_L и менее распространены две короткие изоформы cFLIP_S и cFLIP_R (Smyth et al., 2020). Все перечисленные изоформы имеют по два N-концевых эффекторных

домена смерти и могут быть рекрутированы в DISC, аналогично прокаспазам-8 и 10. Роль cFLIP_S и cFLIP_R хорошо изучена. Обе изоформы, имея незначительные различия в структуре, конкурентно связываясь с FADD блокируют аутопротеолитическую активацию 8 и 10 прокаспазы на DISC. Структурно, cFLIP_L напоминает прокаспазы-8 и -10, С-конец которого содержит область, очень похожую на эквивалентные области прокаспаз, однако эта область каталитически неактивна, так как в ней отсутствует каталитический цистеин и она не обладает цистеиновой протеазной активностью, что делает ее классической псевдопротеазой. Роль длинной формы cFLIP_L остается противоречивой. Первоначально считалось, что аналогично своим коротким изоформам, роль cFLIP_L заключается в ингибировании инициаторных каспаз (Irmeler et al., 1997; Rasper et al., 1998). Действительно, присутствие cFLIP_L приводит к его рекрутированию в DISC вместе с прокаспазами-8, -10 и образование гетеродимеров. Образование гетеродимеров с cFLIP_L энергетически более выгодно, чем образование гомодимеров прокаспазы-8 или -10. Образовавшийся гетеродимерный фермент может эффективно расщеплять соседние гомодимеры, способствуя их процессингу, следовательно, не нарушает процесс передачи сигнала. Также эффективно он расщепляет и соседние гетеродимеры, однако отсутствие цистеина в активном сайте cFLIP_L предотвращает вторую стадию внутридимерного расщепления, он остается в комплексе и, при сверхэкспрессии cFLIP_L, количество гетеродимеров возрастает, что может блокировать дальнейший процесс передачи сигнала (Smyth et al., 2020).

Также, в клетках I типа, активация каспазы-8 опосредуется субъединицей убиквитин-лигазы E3 (кулин3), что приводит к неразрушающему полиубиквитинированию С-концевой области каспазы-8 и связыванию с p62. Это приводит к перемещению каспазы-8 из DISC во внутриклеточные участки содержащие большое количество убиквитина, где в последствии и происходит расщепление и активация каспазы-8 (Jin et al., 2009). Активные каспазы-8 и -10 высвобождаются в цитозоле, там они расщепляют эффекторные каспазы -3 и -7. В клетках II типа, на DISC генерируется менее активная каспаза-8, что не позволяет ей активировать эффекторные каспазы напрямую. Необходимое усиление сигнала

реализуется через внутренний, митохондриальный путь, основная роль в инициации и регуляции которого принадлежит белкам семейства Bcl-2. При этом, активная каспаза-8 за счет расщепления активирует находящийся в цитозоле белок Bid, что приводит к образованию расщепленной формы cBid, состоящей из N-концевой p7 и C-концевой p15 субъединиц, которые изначально связаны друг с другом. Далее активированный cBid накапливается на мембране митохондрий, где происходит разделение субъединиц с отщеплением N-концевой части от способствующей гибели C-концевой p15 субъединицы – tBid (Bleicken et al., 2012; Gross et al., 1999). Основная роль tBid заключается в активации проапоптотических эффекторных белков Bax и Bak, как за счет прямого связывания с ними, так и за счет высвобождения их из комплексов с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2. Реализация указанных функций tBid возможна вследствие повышенной афинности к указанным белкам при локализации его в мембране митохондрии (Bleicken et al., 2017; García-Sáez et al., 2009). Также, tBid может вызывать пермеабиллизацию мембраны митохондрии в отсутствие Bax и Bak, данная эффекторная функция tBid играет важную физиологическую роль при инфекции вызванной *Shigella flexneri* (Flores-Romero et al., 2022). Как было указано выше, Bax, Bak и, вероятно Bcl-2, являясь проапоптотическими эффекторными белками семейства Bcl-2 способны к олигомеризации в мембране митохондрии с образованием поры, что приводит к высвобождению белков межмембранного пространства, таких как цитохром c, OMI/HTRA2, SMAC/DIABLO и эндонуклеаза G. Цитохром c, фактор активации протеазы-1 (APAF-1), dATP и прокаспаза-9 формируют апоптосому. Внутри апоптосомы прокаспаза-9 превращается в активную каспазу-9, которая активирует эффекторные каспазы-3 и -7. Основными регуляторами порообразования выступают антиапоптотические белки семейства Bcl-2, при этом Bax имеет высокое сродство к Bcl-2 и Bcl-XL, а Bak к Mcl-1 и Bcl-XL (Llambi et al., 2011; Willis et al., 2005).

1.3.2 Каспазозависимый путь

Помимо индукции гибели клеток по каспазозависимому пути в результате апоптоза, TRAIL, через свои рецепторы может опосредовать

запрограммированную форму капазоне независимой гибели клеток в результате некроптоза. Некроптоз представляет из себя строго регулируемый процесс, включающий молекулярный путь, отличный от апоптоза. Взаимодействие с рецепторами смерти активирует киназу взаимодействующую с рецептором серин/треонинкиназы (RIPK1), которая аутофосфорилирует и рекрутирует RIPK3 через домены гомотипического взаимодействия RIP (RHIM) имеющегося у обеих киназ (Vandenabeele et al., 2010), с образованием ядра некрсомного комплекса или некрсомы (Degterev et al., 2008; Ofengeim, Yuan, 2013). Далее, RIPK3 активирует псевдокиназу, подобную домену киназы смешанного происхождения (MLKL), которая транслоцируется на плазматическую мембрану (рис. 3). Олигомеризуясь, MLKL приводит к разрыву мембраны клетки с последующей гибелью и высвобождению клеточного содержимого, включая провоспалительные цитокины в микроокружение (Berghe et al., 2014).

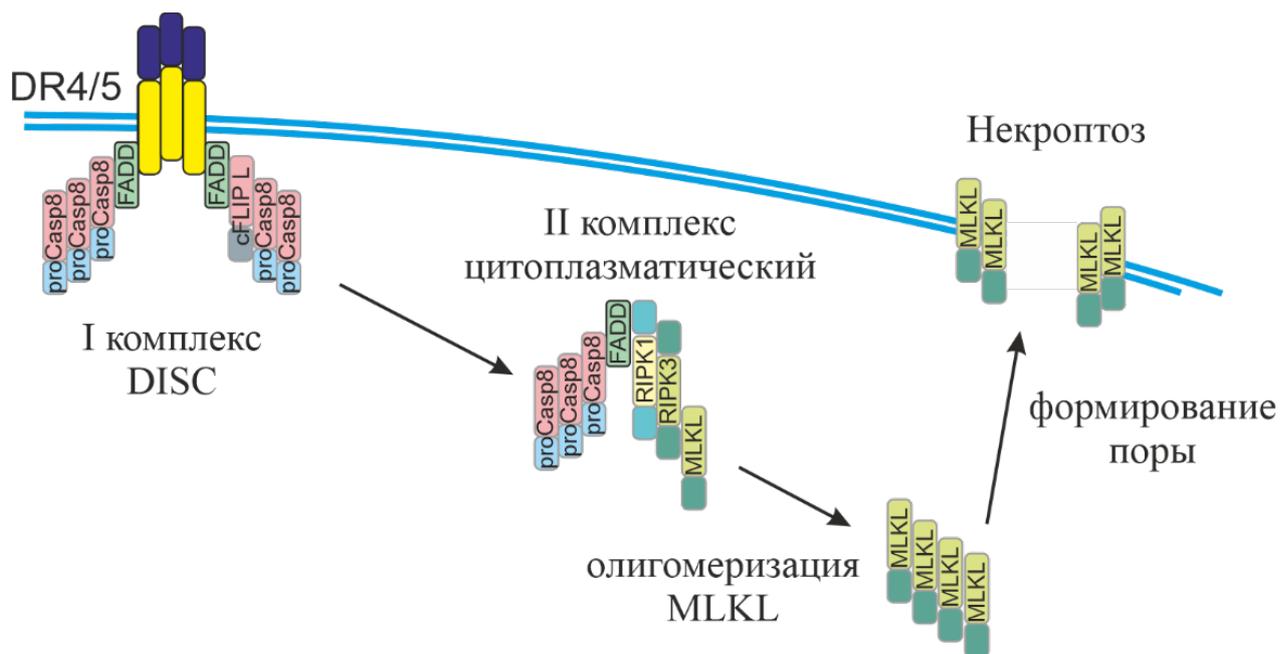


Рисунок 3. Образование цитоплазматического комплекса II, с последующим формированием поры из олигомеризованного белка MLKL приводящей к некроптозу. Иллюстративный материал к пп.1.3.2

Считается, что TRAIL-индуцированный некроптоз происходит из комплекса II, который формируется из DISC, где отсутствует цитозольная часть рецептора к TRAIL, но сохраняется FADD и прокаспаза-8, а также вовлекается RIPK1 (Lafont et al., 2017). При этом развитие некроптоза возможно только в том случае, когда

отсутствует или ингибирована каспаза-8 и FADD, так как каспаза-8 ингибирует некроптоз путем расщепления RIPK1 и RIPK3 (Feng et al., 2007; Oberst et al., 2011). Некроптоз можно ингибировать некростатинами, которые являются ингибиторами RIPK1 (Galluzzi et al., 2014).

Также идентифицирован дополнительный комплекс, индуцирующий некроптоз, названный «рипоптосомой» (Feoktistova et al., 2011; Tenev et al., 2011). Основные компоненты этого комплекса, а именно RIP1, FADD и каспаза-8, в нормальных условиях убиквитинируются IAP, что приводит к их протеосомной деградации и подавлению образования рипоптосом. Однако генотоксический стресс или применение Smac-миметиков может приводить к подавлению IAP, что приводит к спонтанному образованию рипоптосом и запуску каспазо-8-опосредованного апоптоза или некроптоза. При этом, инициация сигнального пути, после образования рипоптосом, регулируется изоформами cFLIP. Комплекс образованный гомодимерами прокаспазы-8 приводит к полной каталитической активности каспазы-8 с последующим апоптозом. Образование гетеродимеров прокаспазы-8 и cFLIP_L приводит к ограничению их каталитической активности, которая, хотя и недостаточна для запуска апоптоза, но способна расщеплять RIP1, что приводит к разборке рипоптосом и выживанию клеток (Feoktistova et al., 2011; Tenev et al., 2011). Если преобладают гетеродимеры прокаспазы-8 и cFLIP_S, то активация каспазы-8 и расщепление RIP1 предотвращаются и происходит образование рипоптосом; в этой ситуации апоптоз блокируется, а режим клеточной гибели вместо этого переключается на некроптоз (Feoktistova et al., 2011).

1.4 Альтернативные, нецитотоксические сигнальные пути TRAIL

Помимо цитотоксического действия, после сборки лиганд-рецепторного комплекса могут активироваться сигнальные пути не связанные с инициацией клеточной смерти. Так образующийся при некроптозе комплекс II, при рекрутировании в него, помимо RIPK1, ассоциированного с TNF фактора 2 (TRAF2), ингибитора апоптоза (сIAP1/2), и других компонентов, рассмотренных ниже, может приводить к подавлению TRAIL-индуцированной гибели, активации сигнальных путей, отвечающих за воспаление, выживание и миграцию клеток (Montinaro, Walczak, 2023). Общая схема представлена на рисунке 4 ниже.

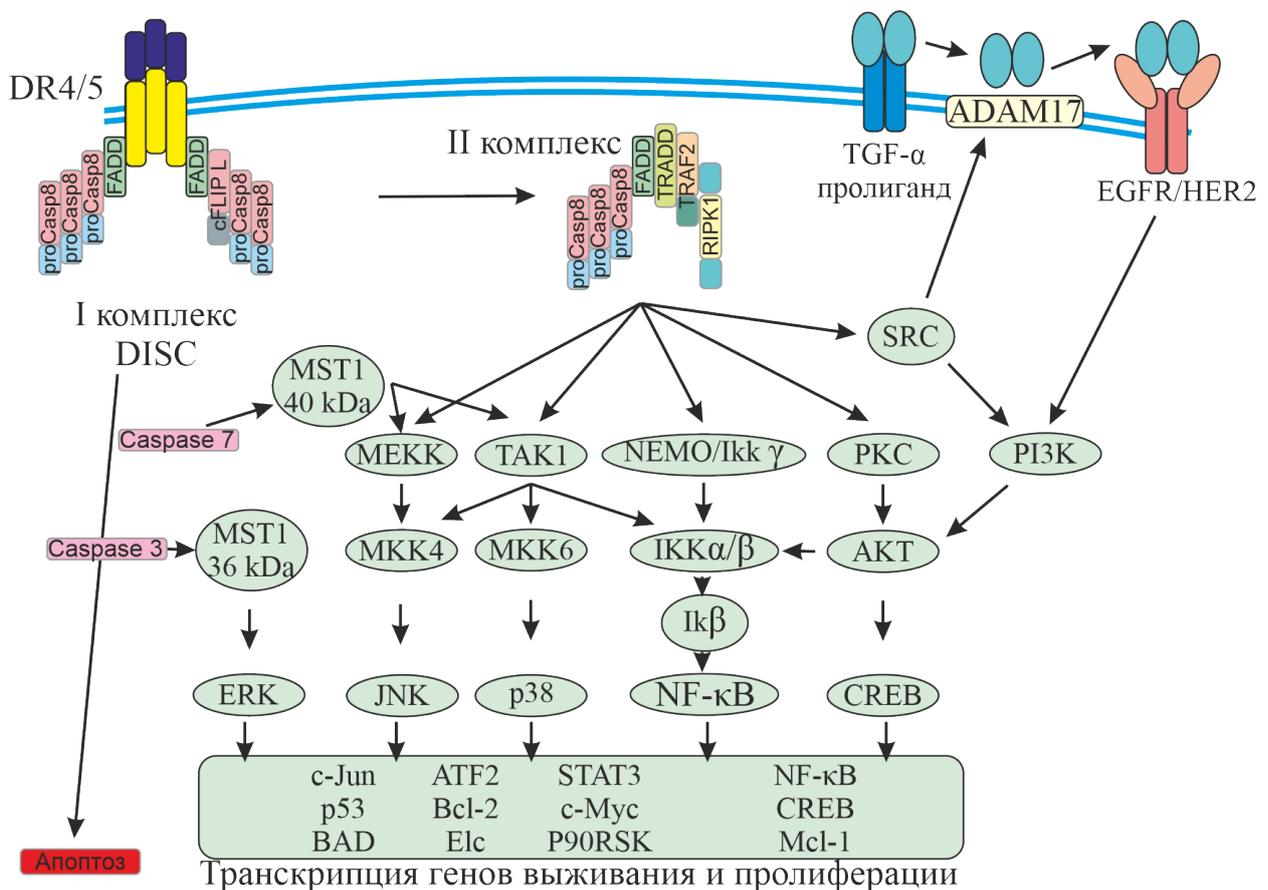


Рисунок 4. Общая схема нецитотоксических сигнальных путей TRAIL приводящих к выживанию и пролиферации. Иллюстративный материал к пп. 1.4

1.4.1 Активация сигнального пути NF-κB

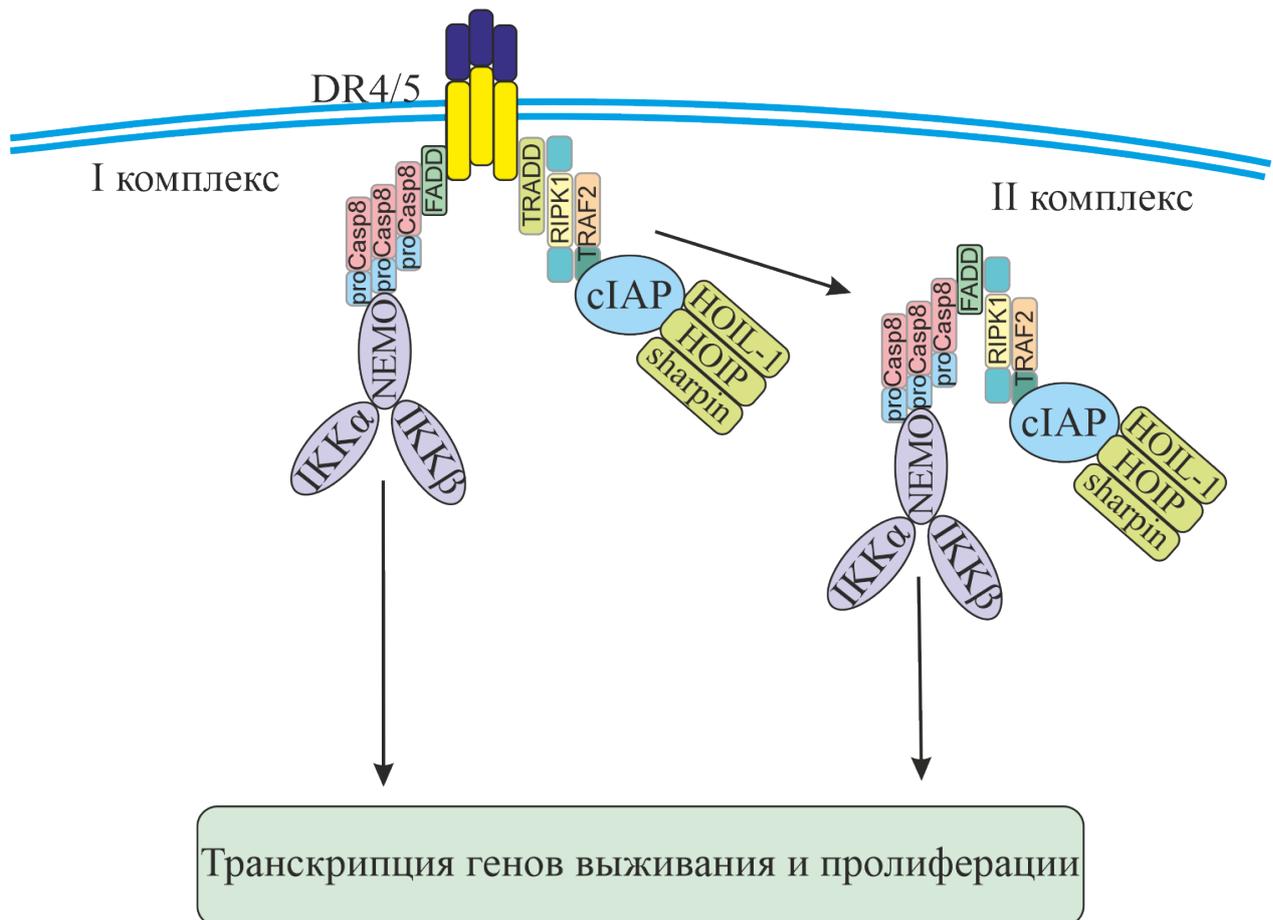


Рисунок 5. Формирование цитоплазматического комплекса приводящего к активации транскрипционного фактора NF-κB. Иллюстративный материал к пп. 1.4.1

Активация внутриклеточных сигнальных путей, находящихся под контролем транскрипционного фактора NF-κB и отвечающих за воспаление и выживание была одним из первых, выявленных нецитотоксических сигналов связанных с TRAIL. При включении во вторичный комплекс FADD или фактора ассоциированного с рецептором TNF первого типа (TRADD), комплекса сборки линейной цепи убиквитина (LUBAC) (состоящего из SHARPIN, HOIL-1 и HOIP) и эссенциального модулятора NF-κB (NEMO), который в свою очередь способен рекрутировать ИКК α/β в сигнальный комплекс, что вызывает фосфорилирование и последующую протеосомную деградацию ингибитора κβ (ИκB) с высвобождением и накоплением в цитозоле NF-κB (Varfolomeev et al., 2005) (Рисунок 5). В дальнейшем происходит транслокация NF-κB в ядро, где он может начать транскрипцию находящихся под его контролем генов, включая гены

кодирующие антиапоптотические белки семейств Bcl-2 и IAP, а также cFLIP (Liu et al., 2017). При этом, NF-κB обладает плеiotропным действием в различных тканях и типах клеток, например в нейронах его активация способствует выживанию клеток, в то время как в клетках нейроглии способствует развитию апоптоза, что несомненно необходимо учитывать при использовании ингибиторов в процессе терапии (Бабкина, Сергеева, Горбачева, 2021; Jennewein et al., 2012) Механизмы влияния сигнального пути NF-κB на типы клеток иммунной системы при воспалении приведены на рисунке 6.

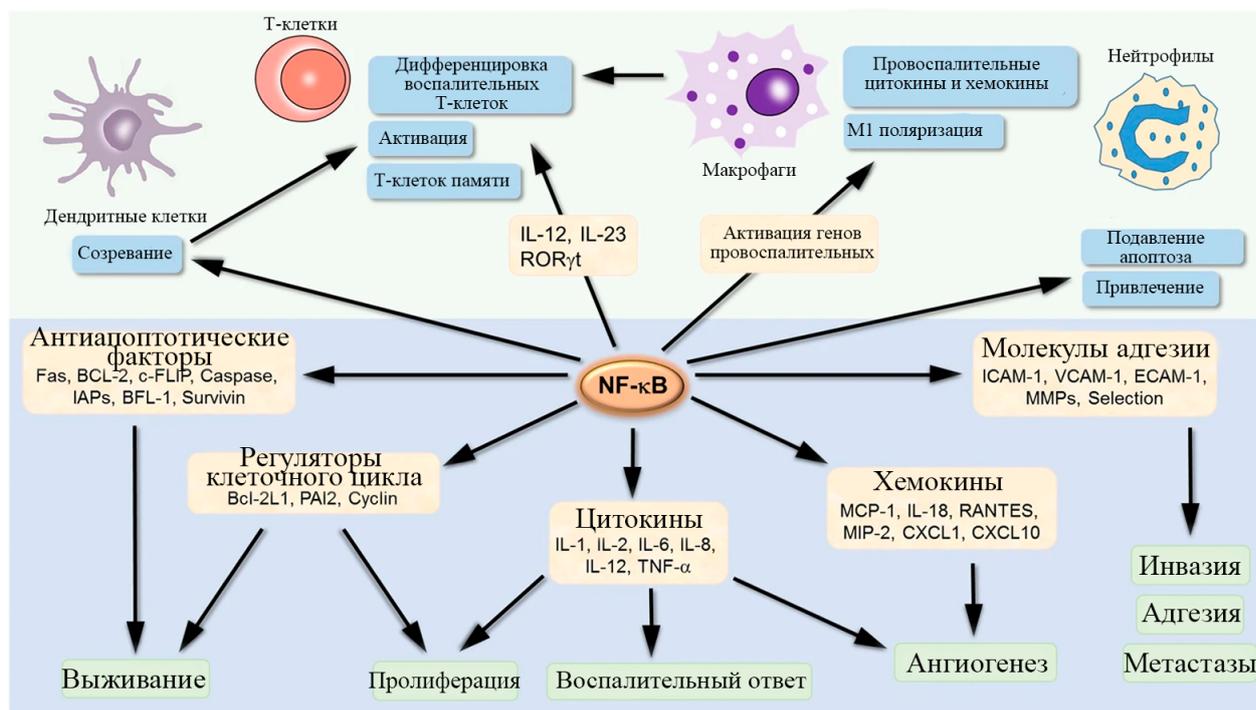


Рисунок 6. Сигнальный путь NF-κB при воспалении. Адаптировано на основании (Liu и др., 2017)

1.4.2 Активация митоген-активируемых протеинкиназ

В клетках млекопитающих идентифицированы шесть различных групп митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК): внеклеточно регулируемые киназы (ERK1/2), c-Jun N-терминальные киназы (JNK1/2/3), p38 (p38 α/β/γ/δ), ERK7/8, ERK3/4 и ERK5 (Chang, Karin, 2001). МАРК контролируют важные физиологические процессы, такие как экспрессия генов, подвижность, метаболизм, митоз и программируемая гибель клеток, при этом TRAIL может активировать c-Jun N-терминальную киназу (JNK), p38 и ERK1/2. В основном они

способствуют клеточной пролиферации и передаче сигналов, способствующих выживанию, но в некоторых клеточных линиях они обладают двойным эффектом.

1.4.2.1 c-Jun N-концевые киназы

JNK являются стресс-активируемыми членами семейства MAPK, но также могут быть активированы TRAIL посредством как каспазозависимого, так и каспазозависимого механизма, в зависимости от типа клеток способом (Mühlenbeck et al., 1998). Для активации JNK в комплексе II является необязательным присутствие FADD. Состав комплекса II и пути активации JNK в разных клеточных линиях также могут варьировать, например, в эмбриональных клетках почки человека (HEK 293) происходят через TRAF2-МЕКК1-МКК4-зависимый сигнальный путь (Hu, Johnson, Shu, 1999). Для клеток рака предстательной железы в составе комплекса II необходим RIP1, в то время как для клеток фибросаркомы в составе комплекса II необходимы и TRAF2, и RIP1 (Varfolomeev et al., 2005). Активация JNK может приводить к противоположным эффектам, подтверждая ее двойной функционал. Например, TRAIL-индуцированная активация пути JNK может способствовать активации апоптоза в лимфоидных клетках (Herr et al., 1999). Активация JNK может приводить к фосфорилированию его мишени, фактора транскрипции c-Jun/AP1, но также может непосредственно фосфорилировать Bim в гепатоцитах, проапоптотический белок семейства Bcl-2, облегчая митохондриальный апоптоз (Corazza et al., 2006). В клетках холангиокарциномы, индуцированные TRAIL JNK и Bim активировали лизосомальный путь гибели (Werneburg et al., 2007). В клетках рака толстой кишки (HCT116), активированная через рецепторы к TRAIL JNK, может фосфорилировать Beclin-1, что приводит к аутофагической гибели клеток (Park et al., 2009). Также двойные функции могут зависеть от продолжительности активации пути, например, при длительной активации JNK через TNF происходит инициация апоптоза, в то время как кратковременная активация JNK способствует выживанию клеток (Ventura et al., 2006). Результат передачи сигнала TRAIL через JNK, как и в случае с белком cFLIP, зависит от изоформы полученной в результате альтернативного сплайсинга, например, в клеточных

линиях рака толстой кишки Colo205 и HCN15 короткие изоформы JNK1 (JNK1 α 1 и JNK1 β 1) передают антиапоптотический сигнал, тогда как длинные изоформы (JNK1 α 2 и JNK1 β 2) передают проапоптотический сигнал (Mahalingam et al., 2009).

1.4.2.2 p38 MAPK

Рядом авторов было показано, что TRAIL может активировать p38 MAPK за счет образования комплекса II, включающего в себя FADD, прокаспазу-8, RIP1 и TRAF2 (Varfolomeev et al., 2005). Также было показано, что повышение уровня активных форм кислорода (АФК) при TRAIL-индуцированном апоптозе в клетках HeLa ответственно за активацию каспазы и апоптотическую гибель (Lee et al., 2002). TRAIL-индуцированная активация p38 происходит в клетках рака толстой кишки DLD1, однако в этих клетках ингибирование p38 не влияло на TRAIL-опосредованную гибель клеток (Zhang et al., 2004). Также как и JNK, p38 может проявлять противоположные эффекты. В клетках рака предстательной железы TRAIL индуцировал фосфорилирование p38, вызывая активацию транскрипции Mcl-1, антиапоптотического белка семейства Bcl-2, что предотвращало апоптотическую гибель. Использование SB203580, ингибитора p38, повышало количество погибших после TRAIL-индуцированной гибели клеток (Son, Varadarajan, Bratton, 2010). Клетки карциномы молочной железы MCF-7, после ингибирования p38, также могут быть сенсibilизированы к TRAIL (Weldon et al., 2004). Таким образом, активация p38 может либо подавлять, либо усиливать апоптотический эффект TRAIL.

1.4.2.3 Протеинкиназы регулируемые внеклеточным сигналом (ERK)

В литературных данных сообщается о возможности активации ERK с помощью TRAIL. В клетках нейроblastомы SK-N-MC, происходило быстрое, в течение 20 минут от момента добавления TRAIL-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 (Milani et al., 2004). Также, ингибирование ERK1/2 может усиливать TRAIL-индуцируемую гибель клеток рака толстой кишки HT-29 (Vaculová et al., 2006). Группой авторов при изучении клеточных линий

мелкоклеточного рака легкого (SCLC), дефицитных по каспазе-8, была показана TRAIL-R2-индуцированная пролиферация, которую можно предотвратить с помощью siRNA-опосредованного нокдауна или ингибированием ERK1/2 (Belyanskaya et al., 2008). Для линий клеток меланомы человека было обнаружено TRAIL-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 течение 30 минут после обработки, при этом ингибирование ERK1/2 приводило к подавлению экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1, что обеспечивало усиление TRAIL-индуцированной гибели по второму, митохондриальному типу в этих клетках (Zhang et al., 2003). Исследование устойчивых к TRAIL-индуцированной гибели клеток злокачественной глиомы человека, показало усиление пролиферации клеток при добавлении препаратов на основе TRAIL, что было связано с фосфорилированием и активацией ERK1/2. Использование ингибиторов MEK1 подавляло TRAIL-индуцированную активацию ERK1/2 и пролиферацию, но не повышало количество клеток чувствительных к TRAIL. Также, нокдаун cFLIP предотвращал TRAIL-индуцированную активацию ERK и приводил к частичной сенсбилизации для TRAIL-индуцированной гибели (Vilimanovich, Vumbasirevic, 2008). Подытоживая вышесказанное можно предположить, что TRAIL-индуцированная активация ERK, как правило связана с повышением выживания и пролиферации опухолевых клеток.

1.4.2.4 TGF- β - активируемая киназа 1

TGF- β - активируемая киназа 1 (TAK1) является членом семейства серин/треонинкиназ MAP3K, действующих выше MAP2K и MAPK, имеющих важную роль в общем пути MAPK (Nguyen et al., 2022). Активируется различными цитокинами, такими как фактор роста опухоли- β (TGF- β), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1) и лиганды Toll-подобных рецепторов. TAK1 является ключевым регулятором активности субъединицы NF- κ B p65/RelA и MAPK. В клетках рака шейки матки (HeLa), TRAIL-индуцированная активация TAK1, приводила к активации p65, JNK и p38, а siRNA нокдаун или ингибирование TAK1 химическими агентами приводило к повышению TRAIL-индуцированной гибели клеток (Choo et al., 2006). TRAIL-

индуцированная активация p38 в клетках рака предстательной железы, показанная в пункте 1.4.2.2, зависела от активации TAK1, это приводило к усилению транскрипции Mcl-1 и, как следствие, подавлению TRAIL-индуцированной гибели клеток (Son, Varadarajan, Bratton, 2010). Другой группой исследователей было показано, что блокирование TAK1 повышает чувствительность клеток к TRAIL-индуцированной гибели. Важным результатом, показанным в их исследовании, выполненном на эмбриональных фибробластах мыши (MEF) и кератиноцитах, полученных от мышей с нокаутом TAK1, а также на клеточных линиях остеосаркомы (Saos2) и HeLa после подавления экспрессии TAK1, повышение чувствительности клеток к TRAIL-индуцированной гибели происходило независимо от активности транскрипционного фактора NF-κB. Воздействие TRAIL, при подавленной активности TAK1 приводило к накоплению АФК с последующей деградацией cIAP, что приводило к активации каспазы-3 и гибели клеток (Morioka et al., 2009). Резюмируя, TRAIL-индуцированная активация TAK1, приводит к повышению устойчивости клеток к гибели и реализуется через путь активации NF-κB, либо за счет активации JNK, p38.

1.4.3 Протеинкиназа С

В литературе присутствуют данные о двойном влиянии протеинкиназы С (PKC) и ее изоформ на TRAIL-индуцированную гибель. TRAIL-индуцированная активация PKC в резистентных клетках аденокарциномы поджелудочной железы (PancTul) оказывала антиапоптотическое действие, а использование Gö6983 ингибитора PKC, повышало количество чувствительных к TRAIL клеток за счет снижения активации NF-κB. Также авторами была показана возможность активации PKC с помощью форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA), после чего TRAIL-чувствительные клетки становились резистентными (Trauzold et al., 2001). Другая группа исследователей показала, что в клетках меланомы, чувствительных к TRAIL-индуцированной гибели, происходит ускоренное фосфорилирование PKC δ и PKC ε после добавления TRAIL, что приводило к выживанию клеток. Также ими было показано, что PMA-индуцированная активация PKC подавляла TRAIL-индуцированную гибель, подавляя активацию и транслокацию Bax,

проапоптотического белка семейства Bcl-2 в мембрану митохондрии и последующее формирование поры (Gillespie, Zhang, Hersey, 2005). Исследователями сообщалось, что активация изоформ PKC ϵ и PKC η внеклеточными стимулами, приводила к повышению устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели. Например, в клетках рака молочной железы (MCF-7) PKC ϵ приводит к активации Akt с последующим фосфорилированием Hdm2, который, в свою очередь, снижал экспрессию p53, что приводило к подавлению Bid и способствовало выживанию клеток (Shankar, Sivaprasad, Basu, 2008). Сообщалось, что активация PKC может ингибировать рекрутирование FADD и прокаспазы-8 в DISC (Harper et al., 2003). Также было показано, что все изоформы PKC α , β , δ , ϵ , ζ и ι участвуют в формировании агрессивного фенотипа рака поджелудочной железы и участвуют в регуляции независимого от прикрепления роста опухолевых клеток (Fleming, Storz, 2017).

Помимо подавления TRAIL-индуцированной гибели, активация α , β , γ изоформ PKC с помощью PMA или Bryostatin-1 может приводить к увеличению экспрессии Bad, проапоптотического белка семейства Bcl-2, и рецепторов к TRAIL, что приводит к сенсбилизации TRAIL-индуцированной гибели (Farrow et al., 2002). Активация α и β изоформ PKC при немелкоклеточном раке легкого (NSCLC) приводило к повышению экспрессии TRAIL-R2/DR5 и повышало чувствительность клеток к TRAIL-индуцированной гибели (Chen et al., 2007). Таким образом, оказывается, что активация изоформ PKC, включая TRAIL-индуцированную, могут приводить как к ингибированию TRAIL-индуцированной гибели, так и усиливать ее, что зависит от типа клеток и их физиологического состояния.

1.4.4 Фосфатидилинозитол-3-киназы

Одним из важных путей пролиферации и выживания клеток является связанный с фосфатидилинозитид-3-киназами (PI3K) и реализуемый через Akt или протеинкиназу B (PKB) (He et al., 2021) (Рисунок 7). Повышение активности пути PI3K/Akt было обнаружено при многих злокачественных новообразованиях (Vara et al., 2004). В иммортализованных клетках Т-лимфоцитов (Jurkat),

добавление TRAIL вызывало фосфорилирование PI3K и Akt в течение 30 минут, а добавление LY294002, являющегося специфическим ингибитором клеточных фосфатидилинозитид-3-киназ, повышало чувствительность клеток к TRAIL-индуцированной гибели (Zauli et al., 2005). Ранее, несколькими группами было показано, что PI3K/Akt способен напрямую фосфорилировать и активировать передачу сигналов p65 и NF-κB, что приводит к повышенной экспрессии антиапоптотических генов. Поэтому повышение чувствительности к TRAIL-индуцированной гибели можно связать со снижением ядерной транслокации NF-κB p65 (He et al., 2021; Nidai Ozes et al., 1999; Tanaka, Fujita, Tsuruo, 2005; Wang, Baldwin, 1998). Также, TRAIL-индуцированное фосфорилирование Akt было показано для других опухолевых клеток. Например, в устойчивых к TRAIL-индуцированной гибели клеточных линиях рака яичников (SKOV3) и рака молочной железы (T47D) в течение нескольких часов после воздействия TRAIL происходило фосфорилирование Akt и его субстрата, серин/треонинкиназы mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих) (Xu et al., 2010). Добавление LY294002 может сенсibilизировать клетки к TRAIL, помимо этого повысить чувствительность можно путем восстановления экспрессии гена-супрессора опухоли PTEN (гомолог фосфатазы и тензина) в PTEN-негативных опухолевых клетках. PTEN ингибирует путь PI3K/Akt путем дефосфорилирования фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфата (PIP3), кофактора активации Akt. TRAIL-индуцированное фосфорилирование Akt происходит в TRAIL-резистентных клетках немелкоклеточного рака легкого линии H460 и чувствительных к TRAIL клетках аденокарциномы предстательной железы линии DU-145 (Azijli et al., 2012).

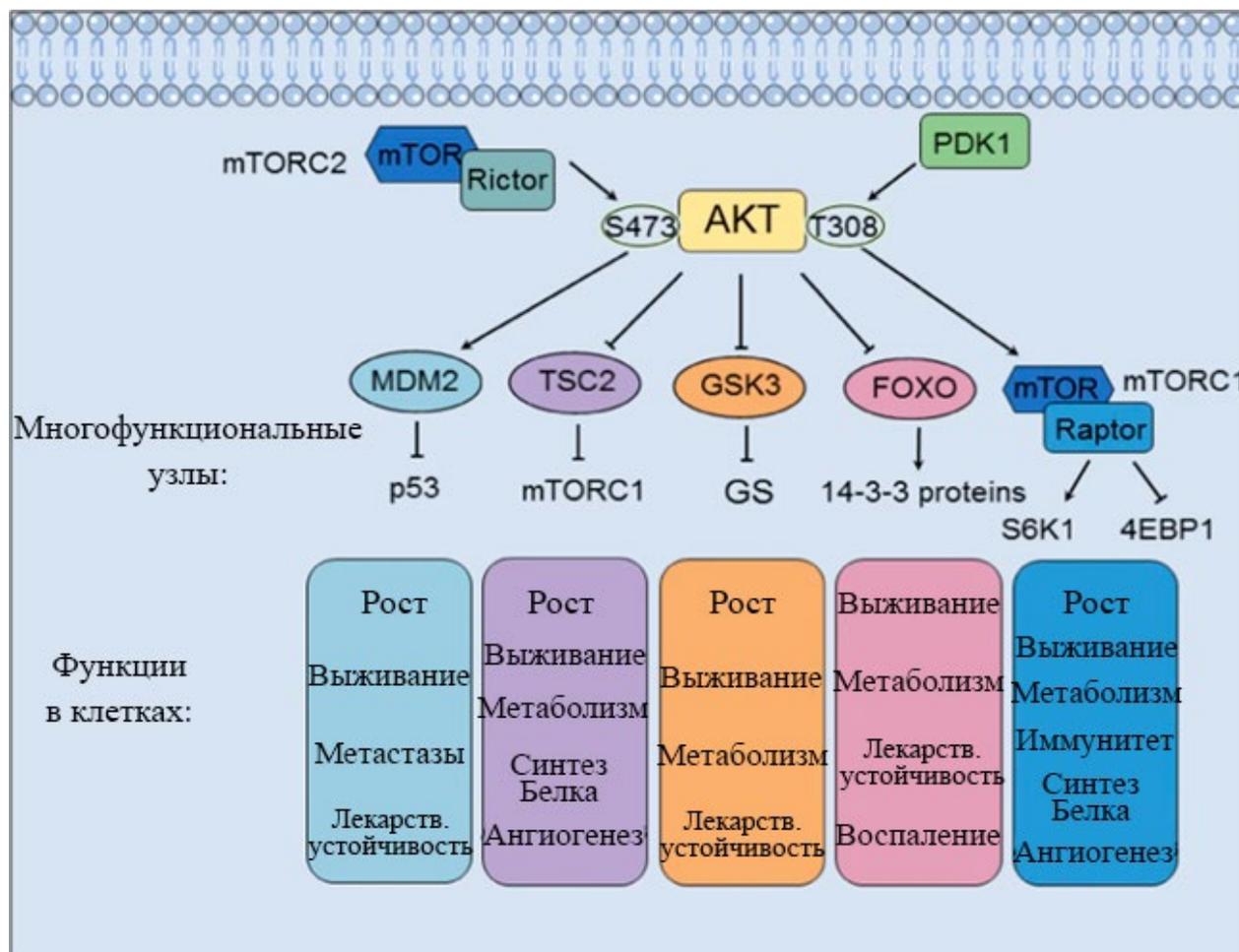


Рисунок 7. Эффекторы сигнального пути PI3K/Akt и их клеточные функции. Активация передачи сигналов Akt может стимулировать (стрелки) или ингибировать (блокирующие стрелки) фосфорилирование нижестоящих эффекторов. Адаптировано на основании (He et al., 2021).

Группа исследователей, моделируя развитие устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели с использованием клеточных линий аденокарциномы предстательной железы человека DU-145 и карциномы поджелудочной железы человека MiaPaCa-2 показала роль нерецепторных протеинкиназ (Src) и убиквитин-протеинлигазы E3 В-лимфомы Casitas (c-Cbl) в TRAIL-индуцированной активации Akt (Song et al., 2010). Основываясь на работе с той же клеточной линией DU-145, ими было выдвинуто предположение, что Akt фосфорилирует свой субстрат Bad, проапоптотический белок семейства Bcl-2, что приводит к инактивации его функции, состоящей в связывании ингибитора апоптоза Bcl-XL и подавлению митохондриального апоптоза (Song et al., 2007). Выдвинутое предположение о возможности Akt фосфорилировать Bad с потерей

им возможность связывать Bcl-XL и Bcl-2, была подтверждено другими группами исследователей (Sastry, Ibrahim, Chouchane, 2020). Также был идентифицирован TRAIL-индуцируемый путь активации Akt, который включал каскад p38 с последующим фосфорилированием белка теплового шока (HSP27), необходимым для каталитической активации Akt (Sun et al., 2011). Таким образом, TRAIL-индуцированная активация пути PI3K/Akt была продемонстрирована на нескольких моделях опухолей и было показано, что ингибирование этого пути повышает чувствительность к апоптозу.

1.4.5 С-терминальная Src протеинкиназа

Как было показано выше для клеток линии DU-145 TRAIL-индуцированная активация Akt была опосредована нерецепторной тирозинкиназой (Src) и при использовании селективного для тирозинкиназ семейства SRC ингибитора PP2, заметно снижалось TRAIL-индуцированное фосфорилирование Akt (Song et al., 2010). Ингибирование Src может восстанавливать чувствительность к TRAIL-индуцированной гибели в резистентных клетках карциномы печени путем облегчения расщепления каспазы-8 (De Toni et al., 2007). По механизму действия Src напрямую связан с устойчивостью к апоптозу. Группой исследователей на модели мыши было показано, что выживание метастатических клеток рака молочной железы в костях зависело от Src. Полученные ими результаты подтверждали данные клинических исследований полученные методом биоинформатического анализа, где была продемонстрирована связь между активацией Src и устойчивостью к продуцируемому микроокружением TRAIL, что позволяло выживать клеткам диссеминированного рака молочной железы в костном мозге (Zhang и др., 2009). Было показано, что помимо активации пути Akt, Src может самостоятельно прерывать сигналы от рецепторов смерти. При активации нерецепторных киназ через эпидермальный фактор роста (EGF), происходит Src-опосредованное фосфорилирование прокаспазы-8 по тирозину 380, тем самым предотвращая образование активных форм каспазы-8 (Cursi et al., 2006). Также была показана возможность не прямой TRAIL-индуцированной активации механизмов выживания через Src, включающая не прямую активацию

рецептора EGF (EGFR). В клетках колоректального рака (CRC), при связывании TRAIL со своими рецепторами может стимулироваться передача сигналов членами семейства эпидермальных рецепторов (HER) человека, EGFR и HER2. При этом происходит активация киназ семейства Src, которые активируют члена семейства металлопротеиназ (ADAM) ADAM-17, основная роль которого заключается в отщеплении трансформирующего фактора роста- α (TGF- α). Далее TGF- α , являющийся лигандом EGFR, активировал передачу сигналов выживания EGFR/HER2 аутокринным и паракринным образом (Van Schaeuybroeck et al., 2008). Таким образом можно предположить, что активация нерецепторных киназ связана с передачей сигналов TRAIL и устойчивостью к гибели.

1.5 Применение TRAIL как терапевтического препарата

Накопленные данные о структуре TRAIL, сигнальном пути и механизмах его действия, а также достаточном количестве результатов, свидетельствующих о том, что TRAIL избирательно индуцирует гибель в онкологически трансформированных клетках, не затрагивая при этом нормальные клетки (Alizadeh Zeinabad, Szegezdi, 2022) подтолкнули исследователей начать разработку фармакологических препаратов, агонистов рецепторов TRAIL. Агонисты включают две большие группы: рекомбинантные TRAIL и антитела-агонисты против рецепторов TRAIL.

1.5.1 Рекомбинантный человеческий TRAIL

Одной из первых рекомбинантных форм цитокина TRAIL не содержащей меток и доказавшей свою эффективность стал AMG951 известный под торговым названием Dulanermin (Ashkenazi et al., 1999). Он состоит из C-концевой части внеклеточного домена TRAIL человека и включает аминокислоты 114—281 (von Karstedt, Montinaro, Walczak, 2017). Dulanermin дошел до фазы II у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого (НМРЛ) и В-клеточными лимфомами (Cheah et al., 2015; Soria et al., 2011). В 2018 году было завершено клиническое исследование фазы III, в котором приняли участие 452 пациента с НМРЛ стадии

III и IV. Исследование рандомизированное с контролем плацебо, распределение пациентов по группам было случайным, исследуемая группа получала дуланермин в сочетании с химиотерапией (винорелбин и цисплатин), контрольная группа - плацебо в сочетании с химиотерапией. Несмотря на положительные оценки, например, выживаемость без прогрессии заболевания составила 6,4 месяца по сравнению с 3,5 месяца в группе плацебо, повышение частоты объективных ответов, коэффициент выживаемости в контрольной группы по сравнению с группой плацебо не улучшился (Ouyang et al., 2018). Другим рекомбинантным TRAIL, прошедшим клинические испытания, стал TRAIL с циклической пермутацией (CPT). Ранние клинические испытания показали хорошую переносимость КПТ отдельно или в составе комбинированной терапии (Micheau, Shirley, Dufour, 2013). CPT проявлял более сильную проапоптотическую активность, чем Dulanermin, но показал тяжелые побочные эффекты, например, CPT-опосредованное повреждение печени во время проведения II фазы (Chen et al., 2012b; Fang, Wang, Yang, 2005).

Также другим коллективом авторов был создан мутантный вариант рекомбинантного человеческого белка TRAIL DR5-B, селективно связывающийся с проапоптотическим рецептором DR5 (Gasparian и др., 2009).

Следующий рекомбинантный полностью человеческий слитый TRAIL-тример SCB-313, испытания которого начаты с 2019 года. В настоящее время участвует в пяти клинических испытаниях со следующими показаниями: злокачественный асцит, перитонеальный карциноматоз и злокачественные плевральные выпоты. Но его эффективность и безопасность еще предстоит определить.

1.5.2 TRAIL-производные

Для улучшения фармакокинетической активности, целевой специфичности и увеличения периода полураспада были разработаны производные TRAIL. Одноцепочечные переменные фрагменты TRAIL (scFv-TRAIL) повышают эффективность уничтожения опухоли, и включают две основные группы. Первая группа молекул обеспечивает двойное нацеливание за счет конструирования scFv-

TRAIL совместно с опухолеассоциированным антигеном, таким как эпидермальный фактор роста (EGFR), белок множественной лекарственной устойчивости (MRP3), мезотелин и др. Вторая группа молекул scFv представляет собой рекомбинантные белки нацеленные на антигены иммунных клеток, такие как CD25, CD47, PD-L1 и многие другие (Dubuisson, Micheau, 2017).

В случае производного scFv-PD-L1 нагружает иммуносупрессивные PD-L1 экспрессирующие миелоидные клетки (дендритные и макрофаги), молекулой TRAIL. За счет конкурентного связывания с PD-L1 оно ингибирует взаимодействие PD-1/PD-L1 и восстанавливает противоопухолевый иммунитет, а поскольку оно также загружает иммунные клетки рекомбинантным TRAIL, то обеспечивает TRAIL-индуцированную гибель опухолевых клеток-мишеней (Hendriks et al., 2016).

1.5.3 TRAIL-конъюгаты, слитые белки и генно-инженерные модификации

С целью преодоления резистентности к TRAIL постоянно идут разработки новых рекомбинантных форм. Одним из подходов стала конъюгация TRAIL с цитотоксическими препаратами. Конъюгат TRAIL с монометилауристатином E (MMAE), PEG-TRAIL-vcMMAE, обеспечивает мощный противоопухолевый ответ в моделях ксенотрансплантата карциномы молочной железы у животных. Также, этот гетеромодифицированный TRAIL показал отличные фармакокинетические свойства, в том числе повышение периода полувыведения до 11,54 часа при минимальной токсичности (Pan et al., 2015). Испытания на животных моделях показали хорошие результаты для AD-O53.2, представляющим собой конъюгат TRAIL с пептидом полученным из белка Smac/DIABLO, внутриклеточного ингибитора XIAP (Pieczykolan et al., 2014). Другим подходом стало создание конъюгата TRAIL с циклическим пептидом iRGD, обеспечивающими улучшенное проникновение конъюгата в опухолевые ткани и специфическое связывание с интегринами $\alpha V\beta 3$ или $\alpha V\beta 5$, биспецифического белка DR5-B-iRGD. Полученный конъюгат продемонстрировал цитотоксичность не только на клеточных линиях глиобластомы, но и на первичных клетках глиобластомы способных к спонтанной

агрегации в трехмерные сфероиды. Также противоопухолевый эффект DR5-V-*i*RGD был подтвержден в исследованиях *in vivo* на модели подкожного ксенотрансплантата клеточной линии глиобластомы человека U-87 мышам BALB/c nu/nu (Yagolovich et al., 2022).

Вступил в фазу I клинических испытаний белок ABBV-621, состоящий из трех связывающих доменов рецептора TRAIL и домена Fc иммуноглобулина G человека. Исследуется эффективность как в моно, так и в комбинированной терапии при лечении солидных или гематологических злокачественных новообразований. По имеющимся предварительным результатам, опубликованным исследователями, ABBV-621, в основном, поддерживает стабильность течения заболевания (Calvo et al., 2019; Ratain et al., 2019).

Для улучшения доставки TRAIL разрабатываются новые подходы. Первый, завершающий II фазу испытаний, заключается в использовании мезенхимальных стромальных клеток, генетически модифицированных для экспрессии TRAIL, MSCTRAIL, был представлен в исследовании, начатом в 2019 году (Clinicaltrials.gov NCT03298763). Второй, основан на терапии химерным антигенным рецептором (CAR), использование которого произвело революцию в Т-клеточной терапии запущенных В-клеточных лейкозов и лимфом (Pehlivan, Duncan, Lee, 2018). Этот подход позволяет генно-инженерным Т-клеткам связываться подобно антителам без молекул МНС, что обеспечивает высокую эффективность связывания и специфичность к опухолевым клеткам (Feins et al., 2019). К сегодняшнему дню было сконструировано только одно CAR антитело к рецептору TRAIL-R1 (TR1-svFv-CAR), оценка которого проводилась в условиях *in vitro*. В этой модели TR1-svFv-CAR проявлял как посредством индукции путей TRAIL, так и CAR-индуцированного цитолиза (Kobayashi et al., 2014).

1.5.4 Агонистические антитела TRAIL-R

Для преодоления ограничений рекомбинантного TRAIL были начаты разработки моноклональных антител-агонистов к рецепторам TRAIL, которые специфически связываются либо с TRAIL-R1 (DR4), либо с TRAIL-R2 (DR5) с высокой аффинностью. В доклинических моделях было показано, что механизм

действия агонистических антител к TRAIL-R вызывает антителозависимую клеточную цитотоксичность и комплементзависимый цитолиз (Dai et al., 2015; Qiu et al., 2012).

1.5.4.1 Агонистические антитела TRAIL-R1

Для TRAIL-R1 были разработаны различные антитела-агонисты, но только антитело HGS-ETR1, также известное как Maratumumab. Оно прошло клинические испытания на людях и достигло второй фазы клинических испытаний (Chuntharapai et al., 2001; Dai et al., 2015; Medler et al., 2019). Maratumumab показал хорошую переносимость и прошел испытания при лечении НМРЛ, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы и гепатоцеллюлярной карциномы. В I и II фазе клинических испытаний Maratumumab продемонстрировал отличный профиль безопасности, вызывал полный или частичный клинический ответ при введении в качестве монотерапии у пациентов с фолликулярной неходжкинской лимфомой. (Younes et al., 2010). Последующие испытания II фазы не подтвердили эффективность, поэтому клинические испытания фазы III еще не начаты. Также проводили оценку эффективности комбинированной терапии, но большинство комбинаций не показали улучшение частоты ответа (Micheau, Shirley, Dufour, 2013).

1.5.4.2 Агонистические антитела TRAIL-R2

В отличие от DR4, для DR5 было разработано намного больше моноклональных антител. К ним относятся Conatumumab (AMG655), Drozitumab (PRO955780), Lexatumumab (HGS-TR2), LBY135, Tigatuzumab (CS-1008) и DS-8273a, как полностью человеческих, так и гуманизированные и мышино-человеческие. Несмотря на обнадеживающие показатели доклинических исследований, результаты клинических испытаний оказались неутешительными. Большинство этих антител оказались относительно безопасными и хорошо переносимыми пациентами, но ни одно из них не показало достаточных клинических преимуществ. В лучшем случае они индуцировали стабилизацию

заболевания, но ни одно из них не улучшало показатели ответа, независимо от того, использовались ли они отдельно или в сочетании с химиотерапией.

В настоящее время начато нерандомизированное многоцентровое исследование фазы I нового рекомбинантного гуманизированного четырехвалентного антитела INBRX-109, нацеленного на TRAIL-R2, идет набор пациентов с местнораспространенными или метастатическими солидными опухолями, включая саркомы (ClinicalTrials.gov NCT03715933).

1.5.4.3 Новые поливалентные антитела

Так как использование моноклональных агонистических антител TRAIL-R1/R2 не приводило к улучшению выживаемости больных в клинических испытаниях, было выдвинуто предположение, что основное препятствие заключается в недостаточной способности этих агентов индуцировать кластеризацию TRAIL-R, необходимую для индукции апоптоза. По этой причине были разработаны мультивалентные антитела против DR4 и анти-DR5, которые показали более высокую эффективность по сравнению с моновалентными и двухвалентными антителами (Dubuisson, Micheau, 2017). Разработка поливалентных антител направлена в основном на DR5 рецепторы. Были разработаны четырехвалентные производные sc-Fv:DR5 и одноцепочечное нанотело scFv:DR5, которые прекрасно показали себя в доклинических моделях, но scFv:DR5 вызывало гепатотоксичность в фазе I клинических испытаний (Liu et al., 2015; Papadopoulos et al., 2015). В настоящее время проходят клинические испытания фазы I с молекулами HexaBody, специфичными для DR5 (ClinicalTrials.gov NCT03576131), четырехвалентным анти-DR5 INBRX-109 (ClinicalTrials.gov NCT03715933) или поливалентным агонистом IgM DR5 (ClinicalTrials.gov NCT04553692) для лечения солидных опухолей.

Также ведется разработка биспецифичных антител, например, Fc-слитый крингл-домен (KD548-Fc) обладающий двойной специфичностью DR4/DR5, он интересен тем, что способен индуцировать TRAIL- и АФК-опосредованную гибель клеток (Jeong et al., 2014). Биспецифические антитела тестируются для различных новообразований, хорошие доклинические результаты были получены

с MCSP (ассоциированный с меланомой хондроитинсульфатный протеогликан) и биспецифическим четырехвалентным антителом DR5, которое позволяло селективно индуцировать DR5-зависимую гибель в клетках меланомы, экспрессирующих MCSP (Dobson et al., 2009; Dubuisson, Micheau, 2017; He et al., 2016).

1.5.5 Комбинированные стратегии

Как уже говорилось, часть опухолей по разным причинам устойчивы к TRAIL (Dai et al., 2015; Qiu et al., 2012; Wajant, 2019). В таком случае, использование TRAIL в комбинации с физическими или фармакологическими терапевтическими подходами может привести к повышению общей выживаемости и обеспечить более эффективную терапию. Агонистические антитела и рекомбинантный TRAIL доказали хорошие профили безопасности, следовательно, их можно комбинировать с химиотерапией и/или лучевой терапией. Например, применение Maratumumab в сочетании с облучением для клеточных линий рака шейки матки усиливало апоптотическую гибель клеток с 51 до 83% по сравнению с монотерапией Maratumumab (ClinicalTrials.gov NCT01088347). Также было показано, что конститутивно устойчивые к TRAIL опухоли могут терять резистентный фенотип при использовании химио- или лучевой терапии (Quintavalle, Condorelli, 2012). Подтверждение такой возможности было получено в исследовании, в рамках которого добавление Dulanermin к химиотерапии обеспечило лучший клинический эффект для пациентов с распространенным НМРЛ (Ouyang et al., 2018).

Биологическая, таргетная и иммунотерапия могут улучшать общую выживаемость при различных злокачественных новообразованиях, также было показано, что они могут в значительной степени влиять на микроокружение опухоли (Hirata, Sahai, 2017; Schirmacher, 2018). Используя эти подходы, можно преодолеть устойчивость опухолевых клеток и поддерживать терапию на основе TRAIL. Синергический эффект от использования таргетной терапии наблюдался в исследованиях Maratumumab с сорафенибом (ClinicalTrials.gov NCT01258608) и бортезомидом (ClinicalTrials.gov NCT00315757), в то время как биологическая

терапия в основном применялась в комбинации Dulanermin с Ритуксимабом (ClinicalTrials.gov NCT00400764) и Бевацизумабом (ClinicalTrials.gov NCT00508625).

Коллективом нашей лаборатории было показано, что использование TRAIL совместно с нетоксической концентрацией сорафениба, эффективно подавляет резистентность в конфлюэнтных культурах и сфероидах *in vitro*. Сорафениб в сочетании с циклическим пептидом iRGD значительно улучшал противоопухолевый эффект рекомбинантного белка izTRAIL в ксенотрансплантатах фибросаркомы человека HT-1080 у мышей BALB/c nude (Fadeev et al., 2019).

1.6 Возможные причины формирования резистентности к TRAIL

Несмотря на преимущества и перспективы использования TRAIL в терапии онкологических заболеваний, исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что несмотря на то, что часть клеточных линий обладают конститутивной устойчивостью к действию TRAIL, большинство чувствительны к TRAIL-опосредованной гибели, но могут приобретать резистентность. Большое влияние на формирование устойчивости оказывает эволюция генома опухоли под давлением отбора. Накопленные исследователями данные показывают, что устойчивость опухолевых клеток к TRAIL-индуцированной гибели может включать множество причин и возникать на любом этапе сигнального каскада TRAIL, например, при активации нецитотоксических путей, как было показано выше в разделе 1.4.

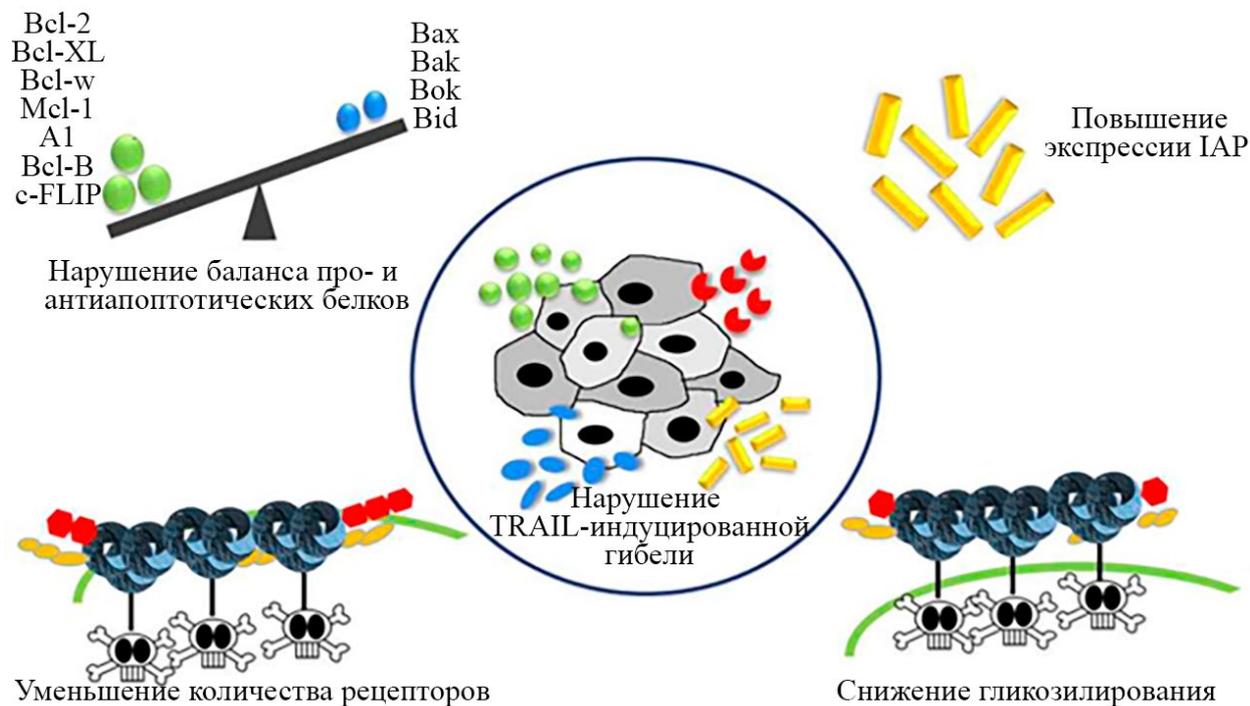


Рисунок 8. Нарушение регуляции TRAIL-индуцированной гибели. Механизмами, ингибирующими апоптоз, являются: (1) нарушение баланса между проапоптотическими и антиапоптотическими белками; (2) снижение функции каспазы; (3) подавление экспрессии рецепторов на поверхности и подавлением гликозилирования. Адаптировано на основании (Wong et al., 2019).

Ниже будут рассмотрены некоторые механизмы участвующие в нарушении регуляции TRAIL-индуцированной гибели, включая: нарушение передачи сигналов рецептора смерти, снижение функции каспазы, нарушение баланса проапоптотических и антиапоптотических белков, подавление гликозилирования и другие (Ching, 2018; Wong, 2011) (Рисунок 8).

1.6.1 Нарушение передачи сигналов через рецепторы

1.6.1.1 Интернализация рецепторов

Первыми ключевыми участниками запуска TRAIL-опосредованной гибели являются рецепторы и связанные с ними лиганды. Было обнаружено несколько аномалий в путях передачи сигнала, которые приводят к отклонению от внешнего пути, одна из которых представляет собой подавление поверхностной экспрессии рецепторов к TRAIL (Wong, 2011). Отсутствие экспрессии проапоптотических рецепторов на наружной мембране ограничивает чувствительность опухолевых

клеток к TRAIL-индуцированной гибели (Di et al., 2013; Rahman, Pumphrey, Lipkowitz, 2009). При этом ряд исследователей сообщали, что уровни экспрессии мРНК и количество белка DR4 и DR5 не коррелируют с устойчивостью к TRAIL, например, чувствительная к TRAIL линия клеток рака молочной железы MDA-MD-231 с высокой экспрессией DR4 и DR5 может использовать подавление DR4 и/или DR5 на клеточной поверхности в качестве механизма позволяющего ей избегать запуска TRAIL-индуцированной гибели (Chen et al., 2012a; Rahman et al., 2009; Zhang, Zhang, 2008). Отсутствие корреляции было подтверждено результатами иммуногистохимического анализа биоптатов рака молочной железы, которые показали неправильную локализацию проапоптотических рецепторов в цитоплазме и ядрах клеток (Chen et al., 2012a). Потеря экспрессии проапоптотических рецепторов на наружной мембране может быть связана с интернализацией посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза, основным регулятором которого является белок Dynamin1 (Dyn1). Дефосфорилирование Dyn1 активирует механизм клатрин-опосредованного эндоцитоза, который затем вызывает эндоцитоз проапоптотических рецепторов, тем самым снижая чувствительность к TRAIL-индуцированной гибели (Austin et al., 2006; Reis et al., 2017). Помимо эндоцитоза, в клетках может нарушаться транспорт проапоптотических рецепторов к плазматической мембране. Группой исследователей на нескольких клеточных линиях было показано, что гиперэкспрессия цитокератинов K8 и K18 подавляет транспорт DR5, задерживая его в ядерном и перинуклеарном компартментах. При этом TRAIL-DR4-опосредованная гибель не изменялась. Нокдаун цитокератинов K8/18, восстанавливал экспрессию DR5 на поверхности клеточной мембраны и TRAIL-DR5-опосредованную гибель (Bozza, Zhang, Zhang, 2018).

1.6.1.2 Влияние гликозилирования рецепторов на устойчивость к TRAIL

Как уже говорилось выше, важным фактором, определяющим возможность кластеризации рецепторов, а, следовательно, влияющим на чувствительность к TRAIL является посттрансляционная модификация рецепторов. Например, гликозилирование рецепторов смерти увеличивало TRAIL-индуцированную

гибель в опухолевых клетках (Dufour et al., 2017; Twomey et al., 2015; Wagner et al., 2007). Гликозилирование эволюционно консервативный механизм, оно заключается в присоединение гликанов к определенным участкам белка, чаще всего к аспарагину (N-связанные) и/или серин/треонину (O-связанные) (Trivedi, Mishra, 2015; Twomey et al., 2015). Катализатором процесса выступает N-ацетилгалактозаминтрансферазой 14 (GALNT14), в дальнейшем процессинг осуществляется фукозилтрансферазой (FUT). Предполагается, что O-гликозилирование может поддерживать стабильность мембраны и предотвращать эндоцитоз рецепторов. Также, этот процесс играет важную роль в облегчении кластеризации рецепторов смерти при связывании лиганда, таким образом участвует в формировании DISC и влияет на активацию каспазных каскадов (Twomey et al., 2015; Wagner et al., 2007). Полногеномное исследование чувствительных и резистентных к TRAIL-индуцированной гибели опухолевых клеток показало более высокую экспрессию мРНК GALNT14 в TRAIL-чувствительных клетках по отношению к TRAIL-резистентным клеткам. Проведенные дополнительно исследования с использованием нокдауна и фармакологического ингибирования ферментов O-гликозилирования, показали, что делеция или подавленная активность GALNT14 снижает чувствительность опухолевых клеток к TRAIL-индуцированной гибели (Wagner et al., 2007). Вышеописанное влияние O-гликозилирования показано для рецепторов DR5, для DR4 аналогичную функцию выполняет N-гликозилирование (Dufour et al., 2017).

Фукозилирование представляет собой присоединение остатка L-фукозы к олигосахариду или белку и является одним из наиболее важных вариантов гликозилирования у опухолевых клеток (Moriwaki, 2010). Общей чертой передачи сигналов через проапоптотический рецепторы является образование DISC и вторичной независимой сигнальной платформы в цитоплазме (называемой комплексом II), основной функцией которой является усиление генерации активной каспазы-8 в цитозоле (Lavrik et al., 2008). Дефицит фукозилирования может влиять на передачу сигналов в DISC и ведет к образованию комплекса II. Снижение фукозилирования, связанное с мутацией GDP-маннозо-4,6-дегидратазы (GMDS), фермента, ответственного за фукозилирование, повышает устойчивость

к TRAIL-индуцированной гибели. Например, дефицит GMDS индуцирует приобретение устойчивости к TRAIL в клетках рака толстой кишки человека и позволяет им ускользать от противоопухолевого контроля, реализуемого NK-клетками (Miyoshi et al., 2012; Moriwaki, Shinzaki, Miyoshi, 2011; Moriwaki et al., 2009). В другом исследовании было показано, что эпигенетическая регуляция фукозилирования может усиливать TRAIL-индуцированную гибель. Для этого 19 клеточных линий были обработаны зебуларинном, ингибитором ДНК-метилтрансферазы, после чего увеличивалась экспрессия генов, отвечающих за фукозилирование. Что примечательно, синергетический эффект не зависел от увеличения экспрессии рецепторов к TRAIL и прокаспазы-8 (Moriwaki et al., 2010). Таким образом, уровень фукозилирования у опухолевых клеток может выступать в роли биомаркера для прогнозирования эффективности таргетной терапии TRAIL. А также выступать в роли мишени для подавления устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели (Moriwaki, 2010).

1.6.2 Влияние cFLIP

Белок ингибирующий клеточный FADD-подобный IL-1P-превращающий фермент (cFLIP), является членом семейства белков, которые могут ингибировать апоптоз, имеет гомологию с каспазой-8, но не обладает протеазной активностью для индукции апоптоза (Bagnoli, Canevari, Mezzanzanica, 2010; Safa, 2012; Shirley, Micheau, 2013). cFlip является плеiotропным белком, в исследованиях *in vivo* было обнаружено, что на ранних стадиях развития cFLIP необходим для регуляции пролиферации T-клеток и развития сердца (Yeh et al., 2000; Zhang, Hopkins, He, 2008). На более поздних стадиях cFLIP может участвовать в негативной регуляции передачи сигналов апоптоза. Как было рассмотрено выше, в разделе 1.3.1, существует 3 изоформы белка cFLIP: длинная форма cFLIP 56 кДа (cFLIP_L), короткая форма cFLIP 26 кДа (cFLIP_S) и 24 кДа изоформа Raji cFLIP (cFLIP_R), которые могут вести себя по разному после рекрутирования их в DISC. Основная негативная роль cFLIP проявляется при активации альтернативных нецитотоксических путей, когда происходит активация транскрипционных факторов, например NF-κB, под контролем которого находятся гены в том числе

cFLIP. В таком случае, возможная гиперэкспрессия любой из форм приводит к блокированию передачи внешнего сигнала клеточной гибели (Liu et al., 2017; Micheau et al., 2001; Smyth et al., 2020).

1.6.3 Ингибирование функции каспаз

Белки-ингибиторы апоптоза (IAP) играют важную роль на передачу сигналов как внешнего, так и внутреннего путей апоптоза посредством ингибирования активности каспаз. Высокая экспрессия белков IAP часто связана со снижением выживаемости, плохим прогнозом и развитием химиорезистентности у онкологических больных (Engesaeter et al., 2011; Hussain et al., 2017; Zhang et al., 2011). Семейство IAP объединяется в группу по наличию хотя бы одного консервативного домена бакуловирусного IAP повтора (BIR), включает 8 представителей, структура которых представлена на рисунке 9 ниже. BIR имеет ключевое значение при взаимодействии IAP со своими белками партнерами, которое выражается в двух вариантах. Первый реализуется через наличие гидрофобной бороздки в доменах BIR2 и BIR3 представленных на cIAP1/2 и XIAP, а также в единственном домене ML-IAP/LIVIN. Эта борозда специфически закрепляет IAP-связывающий мотив (IBM). Наиболее охарактеризованными IBM-несущими белками являются эффекторные каспазы-3, -7, -9 (Kulathila et al., 2009; Srinivasula et al., 2001; Huang et al., 2001) и антагонисты IAP – второй митохондриальный ингибитор каспаз (Smac) и высокотемпературный белок A2 (HtrA2), которые конкурируют с каспазами за связывание с IAP (Liu et al., 2000; Van Loo et al., 2002; Wu et al., 2000). Второй режим взаимодействия не зависит от наличия IBM и реализуется через BIR1. Это взаимодействие связано с промежуточными, вышестоящими звеньями внутриклеточной передачи сигналов. Например, BIR1 домен расположенный на cIAP1/2 позволяет им взаимодействовать с TRAF2, а расположенный на XIAP позволяет ему взаимодействовать с TAK1, что позволяет cIAP1/2 и XIAP принимать участие в активации нецитотоксических путей TRAIL описанных выше (Lu et al., 2007; Samuel et al., 2006; Varfolomeev et al., 2006).

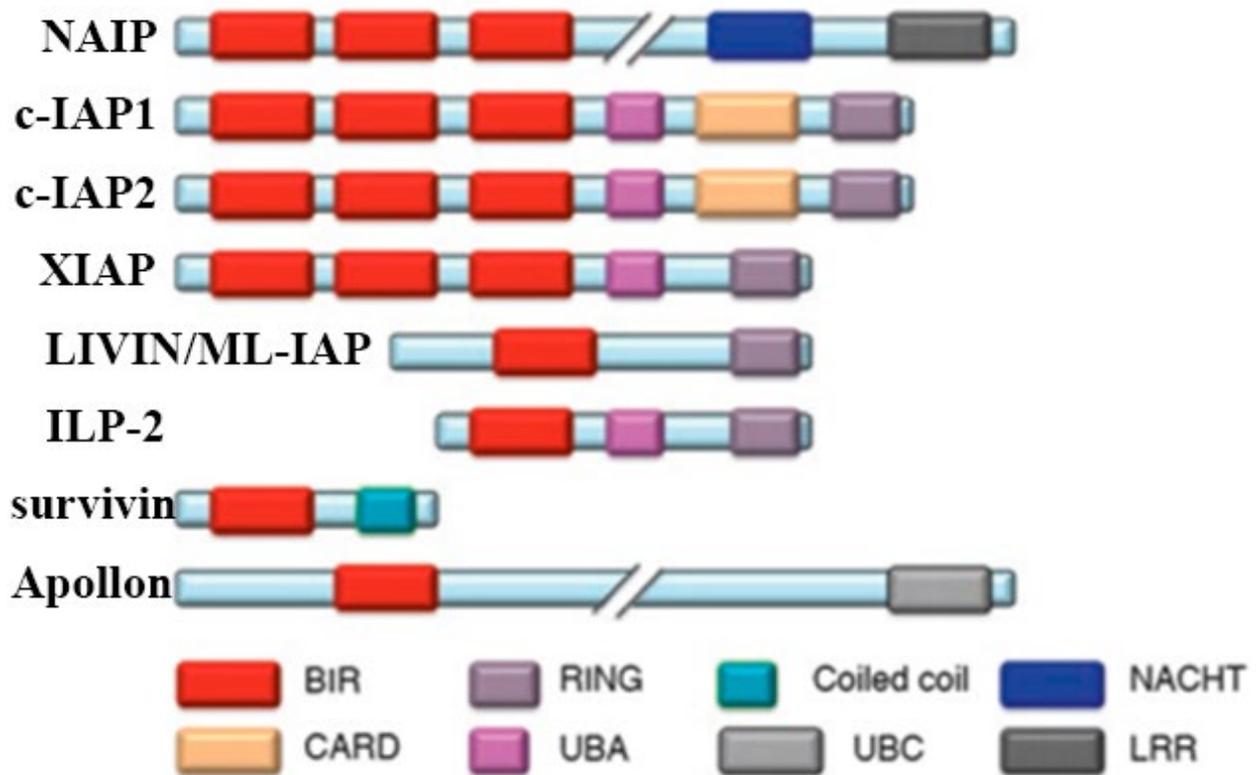


Рисунок 9. Структура белков IAP человека. Все белки IAP содержат по крайней мере один домен бакуловирусных IAP повторов (BIR). Дополнительными доменами являются NACHT (домен, присутствующий в NAIP, трансактиватор МНС класса II (СПТА), синтаза 20-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты (HET-E) и переходный белок 1 (TP1)), богатый лейцином повтор (LRR), убиквитин-ассоциированный (UBA), домен рекрутирования каспазы (CARD), убиквитин-конъюгирующий (UBC) и RING. Адаптировано из [Dubrez, Fulda, 2017]

Другим важным функциональным доменом является домен RING, присутствующий на cIAP1/2, XIAP, ML-IAP/LIVIN и ILP2. RING представляет собой домен цинковых пальцев, дающий активность E3-лигазе в процессе убиквитинирования специфического субстрата (Heride, Urbé, Clague, 2014). Связывание субстрата с BIR модифицирует конформацию белка и способствует димеризации RING, которая необходима для рекрутирования E2-конъюгирующего фермента и для конъюгации убиквитина с лизином субстратами (Dueber et al., 2011; Feltham et al., 2011). Активность E3-лигазы IAP контролируется доменом UBA (ассоциированным с убиквитином), который способствует привлечению заряженного убиквитином E2-конъюгирующего фермента, и CARD (домен рекрутирования каспаз), который стабилизирует cIAP в

неактивной мономерной конформации (Budhidarmo, Day, 2014; Lopez et al., 2011). В дальнейшем убиквитинированные эффекторные каспазы подвергаются протеосомной деградации, что приводит к выживанию клеток.

Также, белки семейства IAP являются важными регуляторами врожденного иммунитета и, что особенно важно, воспаления. В исследованиях было показано, что они положительно регулируют активацию MAPK, IRF и канонического пути NF-κB, способствуя выживанию клеток (Estornes, Bertrand, 2015).

1.6.4 Нарушение баланса Bcl-2 белков

Как упоминалось выше, внутренний путь апоптоза реализуемый через митохондрии обычно регулируется семейством белков Bcl-2, которое имеет четыре общих домена гомологии Bcl (BH1-4), за исключением белков, содержащих только BH-3 (Thomas et al., 2013; Zhang, Fang, 2005). К ним относятся антиапоптотические белки: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1; проапоптотические эффекторные белки: Bax, Bak, Bcl-2L1; белки, содержащие только BH-3: Bid, Bim, Puma, Noxa, Bik. Исследования структуры показали важность взаимодействия этих белковых доменов для проявления про- и антиапоптотических эффектов. Например, проапоптотические белки нейтрализуют антиапоптотическую активность, чтобы устранить препятствие в индукции апоптоза во время цитотоксического стресса. Несмотря на важность белков семейства Bcl-2 для регуляции митохондриального пути клеточной гибели, сигнальный путь реализуемый через TRAIL актуален только для клеток II типа, где недостаточная сборка DISC и активация каспазы-8 направляют сигнальный каскад через внутренний путь, активацию Bax и Bak, а этот процесс строго контролируется балансом белков семейства Bcl-2 (Fulda, Meyer, Debatin, 2002; Kale, Osterlund, Andrews, 2018; Zhang, Fang, 2005).

Повышенная экспрессия генов Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1 была зарегистрирована при раке легкого и молочной железы. Мутация сдвига рамки считывания приводила к дисфункции Bax и Bak у пациентов с раком толстой кишки и острым миелоидным лейкозом (Delbridge, Strasser, 2015; Joensuu, Pylkkänen, Toikkanen,

1994). Основные механизмы активации и взаимодействия белков семейства Bcl-2 были рассмотрены выше, в разделе про каспазозависимый путь. Увеличение количества антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 происходит при многих заболеваниях и состояниях организма, например, аутоиммунных заболеваниях, воспалении. Множество внешних активаторов через факторы транскрипции приводят к нарушению баланса про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 при прогрессировании опухоли, что может приводить к остановке сигнального каскада TRAIL-индуцированной гибели (Campbell, Tait, 2018; Hatok, Raza, 2016).

1.6.5 Фактор транскрипции гена гомеобокса

Основная задача фактора транскрипции гена гомеобокса (Six1) заключается в регулировании пролиферации, выживания, миграции и ингибировании апоптоза в процессе развития (Coletta et al., 2008). Он максимально высоко экспрессируется во время эмбриогенеза, далее его экспрессия постепенно снижается во взрослых дифференцированных тканях (Thangaraju et al., 2012). Тем не менее нарушение регуляции Six1 связано с канцерогенезом и метастазированием опухолевых клеток. Исследователи сообщали об aberrантной гиперэкспрессии Six1 при раке яичников, раке молочной железы и гепатоцеллюлярной карциноме (Behbakht et al., 2007; Coletta et al., 2008; Ng et al., 2006; Reichenberger et al., 2005). Учитывая вышесказанное, можно предположить, что активация Six1 является мощным негативным регулятором TRAIL-индуцированной гибели в опухолевых клетках. Результаты исследований показали, что активация Six1 подавляет TRAIL-индуцированную гибель в клетках карциномы яичников. Напротив, использование siRNA для нокдауна Six1 восстанавливали чувствительность к TRAIL (Behbakht et al., 2007). Таким образом, активация Six1 в процессе развития опухоли подавляет чувствительность к TRAIL и потенциально может быть биомаркером для оценки чувствительности к терапии TRAIL у онкологических больных.

1.7 Возможные условия формирования резистентности к TRAIL

1.7.1 Генетическая гетерогенность

Важную роль в развитии устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели играет клональная селекция опухолевых клеток. В процессе роста и развития опухоли, под влиянием иммунных клеток, ограниченном поступлении кислорода и питательных веществ, а также после применения лекарственных препаратов происходит эволюционирование опухоли, которое приводит к генетической гетерогенности (субклональной изменчивости или внутриопухолевой гетерогенности) (McGranahan, Swanton, 2017; Mota et al., 2022). Исследование с использованием методов секвенирования одиночных клеток сыграло важную роль в понимании базовой биологии развития рака, разработке диагностических и прогностических тестов (Dawson et al., 2013). Таким образом, генетическая гетерогенность опухоли, под влиянием внешних эпигенетических факторов, приводит к эволюционному развитию опухоли, что в конечном итоге приводит к ускользанию клеток от иммунного надзора.

1.7.2 Влияние микроокружения

В настоящее время более пристальное внимание уделяется микроокружению опухоли. На смену существовавшему изначально опухолецентричному взгляду на онкологию пришло понимание необходимости исследовать влияние элементов, пространственно расположенных вокруг опухоли. Собираемые с 70-х годов прошлого века данные показали, что микроокружение играет ключевую роль в содействии или сдерживании развития опухоли (Maman, Witz, 2018; Witz, 2009). Большая часть ранних исследований были сосредоточены на характеристике клеточных и гуморальных иммунных компонентов и их функциях в микроокружении опухоли. Действительно, клетки врожденного иммунитета, в частности макрофаги, инфильтрируют опухоли и являются наиболее значимой популяцией иммунокомпетентных клеток в микроокружении опухоли (Brivio et al., 2017). Поляризация макрофагов в сторону фенотипа M2, приводит к тому, что взаимодействуя с клетками опухоли они способствуют ее росту, высвобождая

различные воспалительные, пролиферативные и ростовые факторы (Tschasen et al., 2012). Кроме того, стромальные клетки могут экспрессировать рецепторы ловушки, что приводит к подавлению противоопухолевой активности как для препаратов на основе TRAIL, так и иммунокомпетентных клеток. Секреция остеопротегерина остеобластами действует как паракринный фактор выживания опухолевых клеток в костном мозге (Locklin et al., 2007).

Следующим шагом стало признание участия роли неклеточных элементов микроокружения. Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой набор макромолекул, собранных в трехмерную структуру и обладающий набором биохимических и биомеханических свойств, регулирующих рост, выживание, подвижность и дифференцировку клеток. ВКМ формирует каркас, регулирует гидратацию, рН, доступность факторов роста и цитокинов (Pickup, Mouw, Weaver, 2014). Компоненты ВКМ могут регулировать чувствительность к TRAIL, например, расположенный на микрофибриллах эластин белок 2 (ELIMIN2), может связываться с рецепторами к TRAIL, обладая сродством к DR4 и в меньшей степени к DR5. Это приводит к кластеризации рецепторов на липидных рафтах, сборке DISC и активации каспазы-8 (Mongiati et al., 2007). Семейство интегрин-связывающих матрицеллюлярных белков CCN обладающее плеiotропными функциями может регулировать клеточную пролиферацию и выживание. В клетках рака предстательной железы при взаимодействии CCN1 с интегринами и геперансульфатными протеогликанами (HSPG) поддерживает клеточную адгезию и способствует росту. В то же время, взаимодействие CCN1 с интегринами и рецептором HSPG Syndecan-4, активируя протеинкиназу C может приводить к сенсбилизации к TRAIL-индуцированной гибели (Franzen et al., 2009). Резюмируя вышесказанное можно утверждать, что ВКМ может модулировать чувствительность к TRAIL (De Looff, De Jong, Kruyt, 2019).

1.7.3 «Опухолевая среда» организма

В настоящее время границы так называемой «опухолевой среды», способной влиять на опухоль, значительно расширены. Группой исследователей было выдвинуто предложение различать уровни «опухолевой среды» от локального,

формирующего микроокружение опухоли, до «опухолевой среды» целого организма. В их работе подчеркивается потенциальное участие отдаленных факторов, которые не могут модифицироваться опухолью, но тем не менее могут влиять на нее. В частности ими рассмотрено влияние системных иммунных компонентов (лимфатических узлов, селезенки и костного мозга), нервной системы и микробиоты, которое может способствовать как прогрессированию онкологии, так и подавлению опухоли (Laplane et al., 2019).

1.7.4 Влияние воспаления

Важным состоянием, влияющим на клетки опухоли, является воспаление. Впервые взаимосвязь между воспалением и раком была показана Рудольфом Вирховым в середине 19 века, в результате своих наблюдений он обнаружил, что опухоль возникает в местах хронического воспаления и что в биоптатах опухоли много воспалительных клеток (Balkwill, Mantovani, 2001). В настоящее время связанное с опухолью воспаление считается ключевой характеристикой опухолевого процесса, а взаимосвязь между хроническим воспалением и развитием опухоли является хорошо установленной (Punt et al., 2016). Накопление данных показывает, что воспалительное микроокружение опухоли оказывает большое влияние на химиотерапию и иммунотерапию (Crusz, Balkwill, 2015; Vasan, Baselga, Hуman, 2019). При этом, острое воспаление вызванное внешними стимулами усиливает противоопухолевый иммунитет, приводя к созреванию дендритных клеток и инициации эффекторных Т-клеток (Ma et al., 2013). Воспаление является защитным иммунным ответом для поддержания гомеостаза тканей путем устранения вредных стимулов, таких как поврежденные клетки, патогены и асептические поражения. В отличие от процессов заживления и элиминации инфекции, при развитии опухоли воспалительная реакция не проходит (Nathan, Ding, 2010). Формируемое опухолью воспалительное окружение может быть вызвано мутациями, инициировавшими онкологическую трансформацию и способствовать прогрессированию опухоли за счет привлечения и активации иммунных клеток. Независимо от причины, вызвавшей воспаление, оно приводит к иммуносупрессивному микроокружению опухоли. И

как только устанавливается воспалительное микроокружение, факторы выделяемые опухолевыми и интерстициальными клетками индуцируют клеточную пролиферацию способствуя выживанию клеток, изначально активируя онкогены и инактивируя гены-супрессоры опухоли в дальнейшем (Ritter, Greten, 2019). Кроме того, важную роль в развитии воспаления и онкологии играет микробиота. Воздействуя напрямую, при воспалительных заболеваниях кишечника и колоректальном раке, и косвенно, через свои метаболиты влияя на дифференцировку и функцию иммунных клеток, потенциально изменяя их действие на опухоль (Kalafati et al., 2020; Schroeder, Bäckhed, 2016).

Воспаление, вызванное терапией онкологических заболеваний, часто придает оставшимся клеткам устойчивость к последующим курсам лечения и усиливает прогрессирование опухоли (Shalapour, Karin, 2015). Таким образом, использование противовоспалительных препаратов в терапии онкологических заболеваний может улучшать клиническую картину (Zheng et al., 2020).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы

Рекомбинантная растворимая форма цитокина TRAIL, модифицированная мотивом изолейциновой «застежки» (izTRAIL) и имитирующая активность мембранносвязанного белка TRAIL была разработана и предоставлена А.В. Чекановым. Для этого был синтезирован мотив изолейциновой застежки и ген TRAIL, которые в дальнейшем клонировали в плазмидном векторе pET101 (Novagen, США). Полученным геном трансформировали штамм E. coli BL21(DE3) и методом микробного синтеза с последующей очисткой металл-аффинной хроматографией получали тримерную форму izTRAIL с молекулярной массой около 80 кДа (Фадеев и др., 2012).

JSH-23, QNZ, NF-kB Activation Inhibitor IV (Selleckchem, США); эмбриональная бычья сыворотка (FBS) (Gibco, США), блокирующий раствор для Fc-рецепторов Human TruStain FcX, моноклональное антитело PE anti-human Ki-67, антитела изотипического контроля PE Mouse IgG1 k isotype Ctrl, APC Mouse IgG1 k isotype Ctrl, FITC Mouse IgG1 k isotype Ctrl, PE Mouse IgG2a k isotype, PE Mouse IgG2b k isotype (BioLegend, США); MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit (Molecular Probes, США). Первичные антитела для иммуноблоттинга: FLIP, Caspase-8 (Enzo, США); GAPDH, FADD (Santa Cruz, США); BID, Bcl-2 (Cell Signaling Technology, США). Вторичные антитела: Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad, США), Anti-mouse IgG HRP-linked (Santa Cruz, США). Питательная среды RPMI 1640, F12, IMDM, фосфатно-солевой буфер, кальцеин AM, bisbenzimidazole Hoechst 33342 (H33342), йодид пропидия (PI), резазурин, липополисахарид из E. coli O111: B4 и другие химические реагенты (Sigma-Aldrich, США).

2.2 Культуры клеток и условия культивирования

В работе использовали клетки острого миелоидного лейкоза человека K562, KG-1, THP-1, HL-60, MV4-11 и U937. Клеточные линии были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-

Петербург) и Американской коллекции типовых клеточных культур (АТСС Манассас, штат Вирджиния, США). Культивирование клеток осуществлялось в питательных средах RPMI-1640/F12 и IMDM, содержание эмбриональной бычьей сыворотки составляло 10% об., для обеспечения антибактериальной и антигрибковой защиты к среде было добавлено 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma, США) и 20 мкг/мл дифлюкана (Pfizer, США). Клетки культивировались в U-образных 96-луночных планшетах при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе (Binder, Германия). Для моделирования активации провоспалительных сигнальных путей, клетки культивировались в присутствии 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) из *E. Coli* O111:B4 (Sigma, США), в течение суток. Для оценки возможного заражения клеточных культур микоплазменной инфекцией проводили тестирование с использованием набора MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit. Заражений выявлено не было.

2.3 Оценка цитотоксического действия белка izTRAIL

Для анализа цитотоксического действия белка izTRAIL клетки из растущих до 3 суток культур высевали в 96-луночные U-образные культуральные планшеты в концентрации 5 тыс. клеток в 100 мкл питательной среды на лунку ($5 \cdot 10^4$ в мл). Белок izTRAIL добавляли через 24 ч (низкоплотные культуры, НПК) и 120 ч (высокоплотные культуры, ВПК) после посева клеток. Жизнеспособность оценивали по отношению количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления izTRAIL) культурах через 24 ч после добавления izTRAIL. Для определения количества живых клеток в культуры инкубировали с резазурином (30 мкг/мл) и измеряли интенсивность флуоресценции с длиной волны возбуждения 535 нм и длиной волны испускания 595 нм используя планшетный спектрофлуориметр Infinity F200 (Tecan, Австрия).

2.4 Анализ ферментативной активности каспаз 3/7

Для анализа активности эффекторных каспаз 3/7 использовали набор Caspase-3 Activity Assay Kit (Cell Signaling Technology, США). Клетки из растущих до 3 суток культур высевали в 96-луночные U-образные культуральные

планшеты в концентрации 5 тыс. клеток в 100 мкл питательной среды на лунку, часть клеток высевалась с добавлением 10 мкг/мл ЛПС из *E. Coli* O111:B4. Через 24 часа собирали клетки контроля и клетки с добавлением ЛПС, через 120 часов собирали клетки высокоплотных культур. Собранные клетки подсчитывали в камере Горяева с использованием светового микроскопа Olympus CX21 (Olympus, Япония), далее проводили трехкратную отмывку клеток фосфатно-солевым буферным раствором, каждый раз осаживая клетки на микроцентрифуге CM-50 (ELMI, Латвия). Для лизиса клеток и экстракции белков к полученным осадкам добавляли буферный раствор, приготовленный согласно протокола производителя реагентов и инкубировали на льду в течение 5 минут. Затем клетки разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора Q700 (Qsonica, США). Полученные лизаты осаждали на микроцентрифуге CM-50 с ускорением 14 000 g, в течение 15 минут с последующим отбором аликвот. В 96-луночный планшет вносили полученные аликвоты и предварительно разведенный до рабочих концентраций субстрат каспаз 3/7, инкубировали при 37 °С в течение получаса на термошейкере PST-100HL (Biosan, Латвия). Интенсивность флуоресценции измеряли с длиной волны возбуждения 360 нм и длиной волны испускания 465 нм используя планшетный спектрофлуориметр Infinity F200 (Tecan, Австрия).

2.5 Вестерн-блот анализ

Для оценки содержания белков в клетках использовали метод иммуноблоттинга. Клетки из растущих до 3 суток культур высевали в 96-луночные U-образные культуральные планшеты в концентрации 5 тыс. клеток в 100 мкл питательной среды на лунку, часть клеток высевалась с добавлением 10 мкг/мл ЛПС из *E. Coli* O111:B4. Через 24 часа собирали клетки контроля и клетки с добавлением ЛПС, через 120 часов собирали клетки высокоплотных культур. Собранные клетки подсчитывали в камере Горяева с использованием светового микроскопа Olympus CX21 (Olympus, Япония), далее проводили трехкратную отмывку клеток фосфатно-солевым буферным раствором, каждый раз осаживая клетки на микроцентрифуге CM-50 (ELMI, Латвия). Для лизиса клеток и экстракции белков к полученным осадкам добавляли буферный раствор RIPA из расчета 1 мл к 20 млн клеток и инкубировали на льду в течение 5 минут.

Затем клетки разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора Q700 (Qsonica, США). Полученные лизаты осаждали на миницентрифуге CM-50 с ускорением 14 000 g, в течение 15 минут с последующим отбором аликвот. Концентрацию белка в аликвотах измеряли по методу Бредфорда (Olson, Markwell, 2007). Лизаты хранили при температуре -27°C .

Электрофоретическое разделение белка проводили в ПААГ 12% с использованием камеры Mini-Protean Tetra cell и источника тока PowerPac Universal Power Supply (Bio-Rad, США). Перенос на нитроцеллюлозные мембраны проводили при помощи системы переноса Trans-Blot Turbo используя набор реагентов Trans-Blot Turbo Transfer Kit (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя.

Блокирование неспецифического связывания мембран проводили в 3% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 0,1% трис-буферного физиологического раствора и полисорбата 20 (TBST). Окраска первичными антителами проводилась в течение ночи при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ при непрерывном покачивании на мини-рокер шейкере MR-1 (Biosan, Латвия). После трехкратной отмывки 0,1% TBST проводили окраску вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре при покачивании на мини-рокер шейкере MR-1. Хемилюминесцентную детекцию блотов проводили гель-документатором ChemiDoc MP с использованием Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США).

2.6 Анализ представленности рецепторов к TRAIL на поверхности клеток

Для анализа поверхностной экспрессии рецепторов к TRAIL, клетки из растущих до 3 суток культур высевали в 96-луночные U-образные культуральные планшеты в концентрации 5 тыс. клеток в 100 мкл питательной среды на лунку, часть клеток высевалась с добавлением 10 мкг/мл ЛПС из E. Coli O111:B4. Через 24 часа собирали клетки культуры низкой плотности (НПК) и клетки с добавлением ЛПС, через 120 часов собирали клетки высокоплотных культур (ВПК). Собранные клетки отмывали в буфере для окрашивания клеток (BioLegend, США) с использованием микроцентрифуги MR-1 при 300 g в течение 5 минут. Окрашивание проводили с

использованием моноклональных антител к PE anti-human CD261 (TRAIL-R1, DR4) (BD Bioscience, США), APC anti-human CD262 (TRAIL-R2, DR5) (BioLegend, США), FITC anti-human CD263 (TRAIL-R3, DcR1) (BD Bioscience, США), PE anti-human CD264 (TRAIL-R4, DcR2) (BioLegend, США). Для оценки возможности неспецифического связывания антител, клетки окрашивали антителами APC Mouse IgG1 k isotype Ctrl, FITC Mouse IgG1 k isotype Ctrl, PE Mouse IgG1 k isotype, PE Mouse IgG2a k isotype, APC Mouse IgG2a k isotype (BioLegend, США). Окрашивание проводилось в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, с последующей фиксацией 2% раствором параформальдегида. Анализ проводили методом проточной цитометрии на приборе BD Accuri C6.

2.7 Секвенирование транскриптомов

Для проведения полного секвенирования РНК, клетки из растущих до 3 суток культур высевали в 96-луночные U-образные культуральные планшеты в концентрации 5 тыс. клеток в 100 мкл питательной среды на лунку, часть клеток высевалась с добавлением 10 мкг/мл ЛПС из E. Coli O111:B4. Через 24 часа собирали клетки контроля и клетки с добавлением ЛПС, через 120 часов собирали клетки высокоплотных культур. Собранные клетки подсчитывали в камере Горяева, отбирали для исследования 2 млн клеток. Далее, клетки однократно отмывали PBS с использованием микроцентрифуги MR-1 и заливали раствором EverFresh RNA и передавали для исследования в Лабораторию секвенирования генома (рук. Ермаков А.М.), где методом нанопорового секвенирования, с использованием прибора MinION, ячейкой SpotON Flow Cell (R9.4) Single, набора реагентов Flow Cell (Oxford Nanopore Technologies) проводилось полное секвенирование РНК с получением первичных данных.

2.8 Компьютерные методы обработки первичных данных транскриптомов.

Обработка первичных данных транскриптомного анализа и распознавание нуклеотидов по исходному сигналу (бейз-коллинг), демультимплексирование

полученных данных проводилось с помощью программы Guppy basecaller v5.0.16 (Oxford Nanopore Technologies). Верификация результатов работы проводилась в программе оценки качества R-minIONQC.R. Полученные данные выравнивали, сопоставляли с референсной базой данных и картировали в программе Minimap2 (Oxford Nanopore Technologies). Для определения уровня экспрессии генов использовали программу Salmon. Полученные данные использовались для проведения биеформатического анализа.

2.9 Биоинформатический анализ транскриптомов

Для полученных данных РНК секвенирования клеток в НПК и ВПК производился анализ дифференциальной экспрессии генов с использованием онлайн сервиса iDEP.951 (Ge, Son, Yao, 2018) и доступного в сервисе пакета для языка программирования R DESeq2 (Love, Huber, Anders, 2014). В результате были получены данные кратности изменения (КИ) экспрессии генов в ВПК относительно НПК в логарифмической форме ($\log_2(\text{КИ})$). Анализ обогащения наборов генов производился с использованием наборов генов из базы данных молекулярных сигнатур (MSigDB, v.2022.1) с использованием подключаемого пакета для языка программирования Python (v. 3.10). Анализ функциональной представленности генов осуществлялся с использованием дифференциально экспрессируемых генов, изменение экспрессии которых соответствует параметрам $-1 \leq \log_2(\text{КИ}) \leq 1$. Дифференциально экспрессируемые гены аннотировались по базам данных GeneOntology (GO) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) с использованием программного обеспечения Cytoscape (v. 3.9.1) и подключаемых модулей ClueGO (v. 2.5.9) и CluePedia (v. 1.5.9). Визуализация сетей белок-белковых взаимодействий также осуществлялась с применением программного обеспечения Cytoscape.

Полученные первичные данные транскриптома после вычисления метрик изменения экспрессии генов были переведены в диапазон изменений ВПК по отношению к НПК (FC) и переведены в формат логарифма по основанию 2 (Log2FC). Анализ функциональной принадлежности и визуализацию сетей молекулярного взаимодействия генов проводили с помощью программного

обеспечения с открытым исходным кодом GSEA (v. 4.2.3), Cytoscape (v. 3.9.1) и онлайн сервиса IDEP.951. Наборы генов, соответствующие различным физиологическим состояниям и заболеваниям, брали из баз данных молекулярных сигнатур MSigDB и Hallmark. Аннотацию генов проводили с помощью баз данных Gene Ontology (GO) и Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) с использованием плагинов для программного обеспечения Cytoscape: ClueGO (v. 2.5.9), nCluePedia (v. 1.5.9).

2.10 Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Для количественной оценки изменений экспрессии отдельных генов использовали ПЦР в реальном времени. Клетки из растущих до 3 суток культур высевали в 96-луночные U-образные культуральные планшеты в концентрации 5 тыс. клеток в 100 мкл питательной среды на лунку, часть клеток высевалась с добавлением 10 мкг/мл ЛПС из *E. Coli* O111:B4. Через 24 часа собирали клетки контроля и клетки с добавлением ЛПС, через 120 часов собирали клетки высокоплотных культур. Собранные клетки подсчитывали в камере Горяева, отбирали для исследования 2 млн клеток. Далее, клетки однократно отмывали PBS с использованием микроцентрифуги MR-1 и заливали раствором EverFresh RNA. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Германия). Синтез и амплификацию кДНК проводили с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR (Евроген, Россия) на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Scientific, США), согласно инструкции производителя.

2.11 Статистический анализ

Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в пяти повторах ($n \geq 5$). Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма-Сидака, $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Повышение устойчивости клеток миелоидного лейкоза ТНР-1 к TRAIL-индуцированной гибели в высокоплотных культурах

Согласно литературным данным, при остром лейкозе клетки в костном мозге накапливаются в высоких концентрациях, формируя гиперклеточные структуры (Li et al., 2018). Нами была предложена *in vitro* модель, отражающая повышение концентрации лейкозных клеток в ограниченном пространстве костного мозга. На рисунке 10 представлены характеристики модели, предложенной для исследования повышения устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели в высокоплотных культурах. Клетки миелоидного лейкоза человека, ТНР-1, высевали по $5 \cdot 10^3$ клеток в 100 мкл питательной среды в лунки U-образного культурального планшета. Через 24 часа после посева количество клеток в лунке увеличивалось до $1 \cdot 10^4$, и в каждой лунке формировался единичный трехмерный многоклеточный агрегат, мы использовали их как культуры низкой плотности (НПК) (рис. 1а). Через 120 часов количество клеток в лунке увеличивалось до $1 \cdot 10^5$, формируя высокоплотную культуру (ВПК) и сохраняя форму единичного трехмерного агрегата (рис. 10в). В отличие от многоклеточных сфероидов, образуемых клетками солидных опухолей, трехмерные многоклеточные агрегаты из клеток ОМЛ имеют «рыхлую» структуру и могут быть разрушены даже легким перемешиванием питательной среды. Ниже представлен график роста числа клеток ТНР-1 (рис. 1г) и процент погибших клеток (рис. 10д) в течение 10 суток культивирования. Через 120 часов культивирования клеточная культура находилась в стадии экспоненциального роста и число погибших клеток не превышало $1,8 \pm 0,4\%$. Увеличение процента погибших клеток и торможение роста количества клеток в культуре после 6 суток (рис. 10г, д) указывает, что неблагоприятные изменения клеточного микроокружения в высокоплотных культурах начинаются с этого времени.

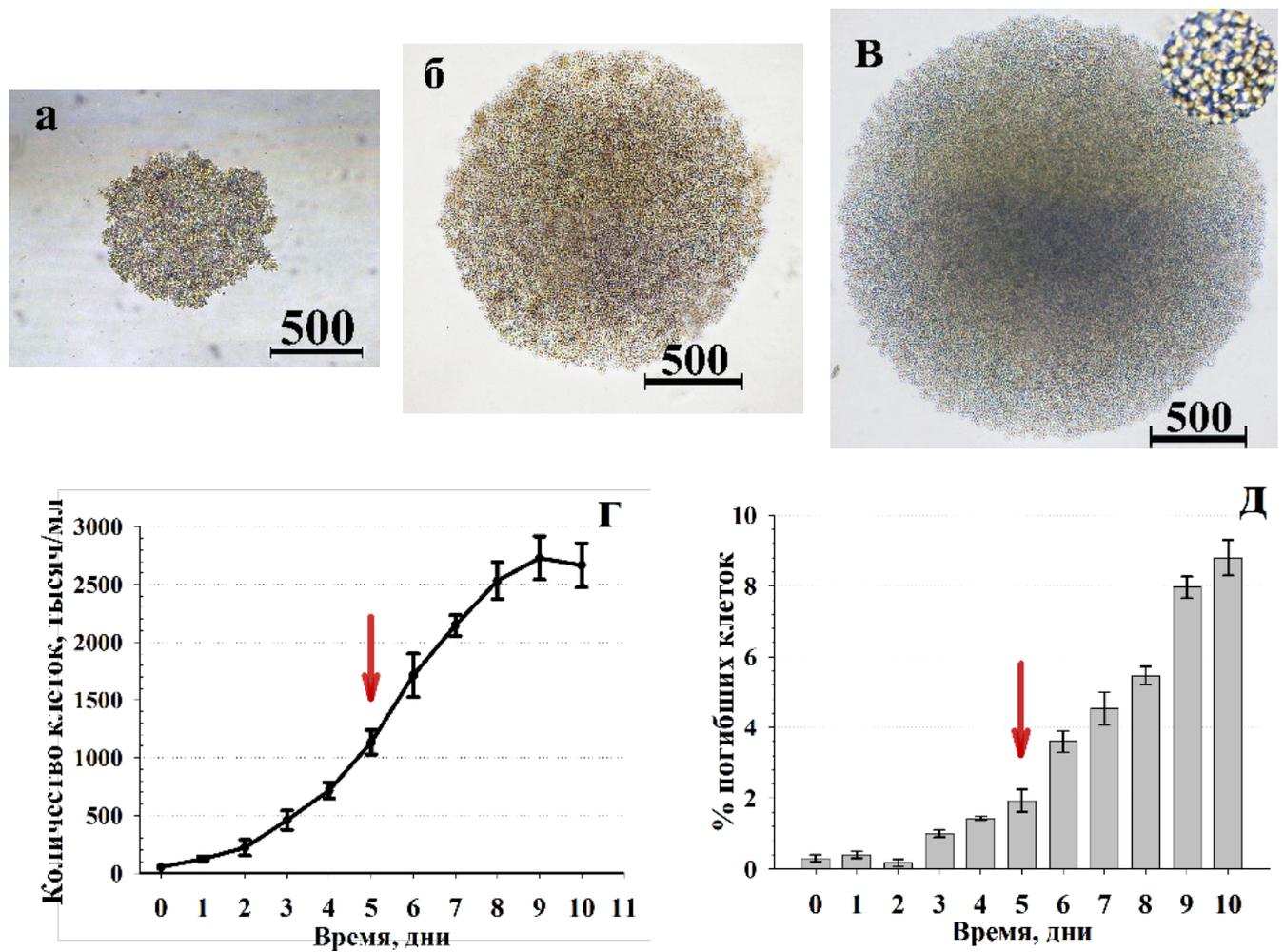


Рисунок 10. Микрофотографии культур клеток THP-1 через 24 (НПК) (а), 72 часа (б) и 120 (ВПК) (в) часов. График скорости роста клеточной линии THP-1 (г), количество мертвых клеток в процентах (д). Стрелкой отмечены культуры используемые как ВПК.

Для изучения цитотоксического действия белка izTRAIL на клетки THP-1, клетки из растущей культуры высевали в U-образные планшеты и через 24 (НПК), 72 и 120 (ВПК) часов после посева добавляли izTRAIL в концентрации от 0,23 до 1500 нг/мл. Через 24 часа после посева $16 \pm 4\%$ клеток были устойчивы к действию izTRAIL даже в максимальной концентрации (1500 нг/мл), а к 72 часам количество таких резистентных клеток увеличилось до $50 \pm 4\%$. Через 120 часов от посева, в высокоплотной культуре (ВПК) $74 \pm 2\%$ клеток становилось резистентными к действию izTRAIL (Рис. 11 а).

Аналогичные результаты были получены нами при исследовании повышения устойчивости к действию izTRAIL для мезенхимных клеток фибросаркомы

человека линии НТ-1080, у которых при формировании трехмерных многоклеточных структур более 70% клеток становились резистентны.

Далее мы показали, что резистентность клеток ОМЛ в ВПК имеет обратимый характер. Для этого клетки из ВПК переносили в новые U-образные 96-луночные планшеты, в концентрации 5×10^3 клеток в лунку и культивировали 24 часа, после чего добавляли izTRAIL и культивировали еще 1 сутки (на графике НПК восст.). При переносе резистентных клеток ТНР-1 из ВПК, в НПК, происходило восстановление чувствительности клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу (рис. 11 б).

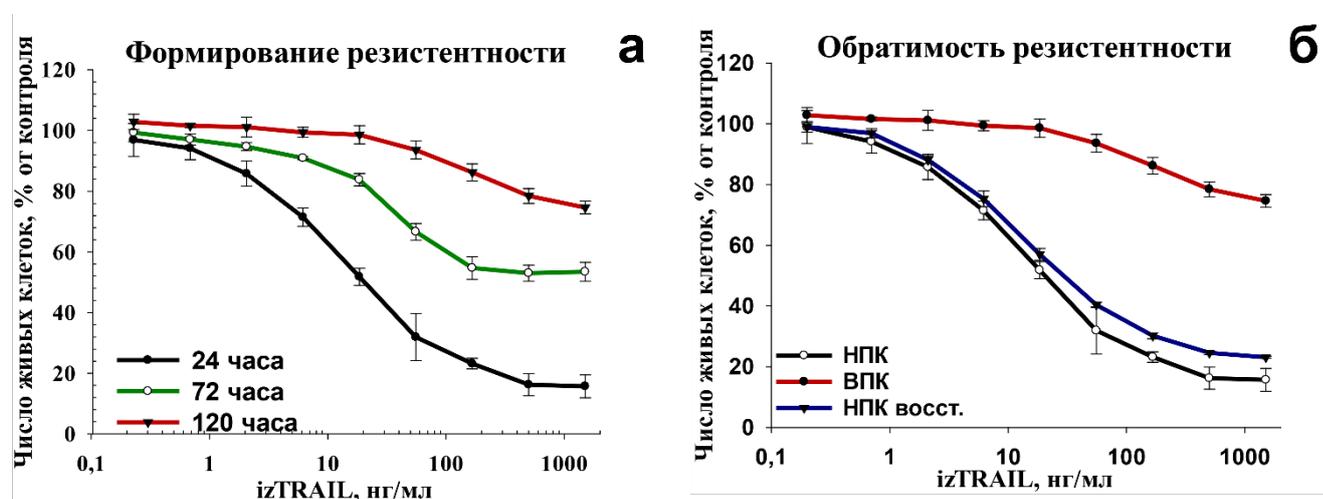


Рисунок 11. Цитотоксическое действие izTRAIL на клетки линии ТНР-1 через 24 (НПК), 72 и 120 (ВПК) часов после посева по 5 тыс. клеток в планшеты с U-образным дном (а). Обратимость устойчивости культуры клеток ТНР-1 (б). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 10$).

Таким образом, по мере увеличения концентрации и формировании высокоплотной культуры клетками ТНР-1, происходит повышение их устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели, и при этом устойчивость носит обратимый характер.

Повышение TRAIL-устойчивости клеток лейкоза линий MV4-11, U937, HL-60, K562 и KG-1 в высокоплотных культурах

Для определения общности эффекта повышения устойчивости клеток миелоидного лейкоза, было выполнено исследование перечисленных линий к TRAIL-индуцированному апоптозу через 24 часа (НПК) и 120 часов (ВПК) после посева (рис. 12).

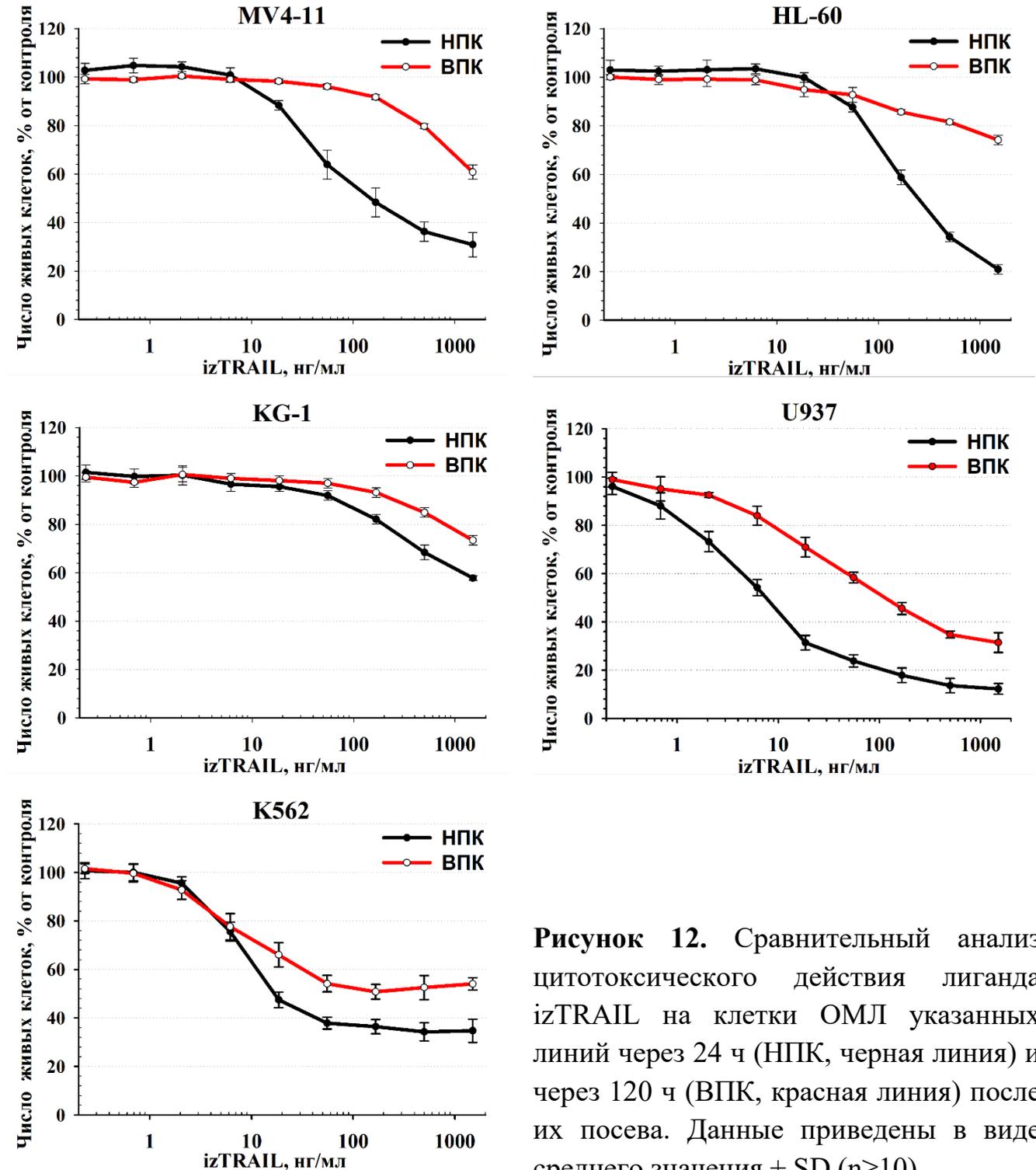


Рисунок 12. Сравнительный анализ цитотоксического действия лиганда izTRAIL на клетки ОМЛ указанных линий через 24 ч (НПК, черная линия) и через 120 ч (ВПК, красная линия) после их посева. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 10$).

Было показано, что для клеток миелоидного лейкоза MV4-11, U937, HL-60 и K562 (в меньшей степени) выявляется повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели в ВПК. Повышение TRAIL-устойчивости клеток KG-1 в ВПК было наименее значимо. Полученные результаты показывают, что феномен повышения TRAIL-устойчивости в высокоплотных трехмерных культурах выявляется для различных клеток миелоидного лейкоза и согласуется с тем, что было обнаружено нами для клеток сарком и карцином (Fadeev et al., 2012).

В связи с тем, что максимальная выраженность эффекта повышения TRAIL резистентности в ВПК показана для клеток ТНР-1, исследование механизма указанного феномена выполняли с использованием данных клеток.

Влияние концентрации клеток ТНР-1 и роли возможных ограничений доставки izTRAIL в высокоплотных культурах на повышение их устойчивости

Одной из возможных причин повышения устойчивости можно предположить недостаток цитотоксического лиганда TRAIL длякратно возросшего количества клеток. Для определения зависимости TRAIL-резистентности от концентрации клеток в ВПК, клетки ТНР-1 высаживали в лунки U-образного 96-луночного планшета, в концентрации 1×10^5 клеток в 100 мкл питательной среды в лунку, что соответствует ВПК, и, немедленно, к клеткам добавляли белок izTRAIL (на графике 1×10^6 кл/мл). В данных условиях наблюдали повышение резистентности клеток ОМЛ ТНР-1 к TRAIL-индуцированной гибели, но гораздо менее выраженное, чем в условиях ВПК, без увеличения количества абсолютно резистентных к действию белка izTRAIL клеток (рис. 13а).

Хорошо известно, что трехмерная структура во многом определяет доступ цитотоксических агентов в многоклеточных культурах клеток, например, в случае многоклеточных сфероидов (Grayson et al., 2021). Для определения зависимости TRAIL-резистентности от трехмерной структуры ВПК, клетки ТНР-1 в ВПК аккуратно ресуспендировали, добавляли к суспензии клеток izTRAIL и культивировали еще 1 сутки (ВПК+перемешивание). Перемешивание разрушало трехмерную структуру ВПК, но не изменяло резистентность клеток ТНР-1 к

TRAIL-индуцированному апоптозу, по сравнению с недиссоциированной ВПК (рис. 13б).

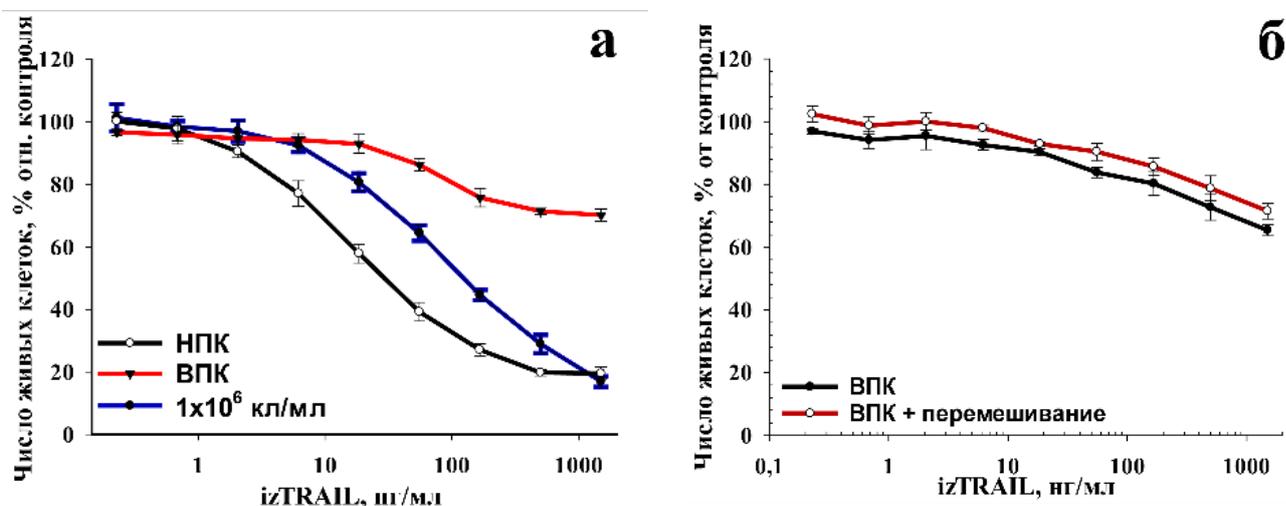


Рисунок 13. Исследование зависимости TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в высокоплотной культуре (ВПК) от концентрации клеток (а) и трехмерной структуры ВПК (б). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 10$).

Таким образом, полученные результаты показывают возможность повышения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в ВПК. Повышение TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в ВПК является обратимым, не связано, с непосредственным повышением количества клеток в культуре, а также не зависит от трехмерной структуры ВПК.

3.2 Биоинформатический анализ транскриптома клеток ОМЛ ТНР-1 в трехмерных культурах высокой и низкой плотности.

Для выяснения механизмов повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в высокоплотных культурах было выполнено секвенирование транскриптома клеток ТНР-1 в ВПК в сравнении с НПК. Всего обнаружено 15 тыс. транскрибируемых генов, из которых отобраны достоверно дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) с поправкой на множественное тестирование Беньямини-Хохберга ($FDR \leq 0,05$) (Benjamini, Hochberg, 1995) с кратностью изменения (КИ): $-1 \leq \text{Log}_2(\text{КИ}) \leq 1$. Заданным параметрам

соответствовали 121 ДЭГ, из которых 92 гена обладали повышенной экспрессией и 29 генов пониженной экспрессией. Далее эти гены были проанализированы с помощью базы данных «Генная онтология» (Gene Ontology, GO) (Thomas et al., 2022), по трем словарям – биологические процессы (Biological Processes, GO:BP), молекулярные функции (Molecular Functions, GO:MF), клеточные компоненты (Cellular Components, GO:CC), а также с помощью интернет ресурса «Киотская энциклопедия генов и геномов» (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) (Kanehisa 2000), по базе данных KEGG PATHWAY (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Было показано, что по словарю GO:BP ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью были ассоциированы с позитивной регуляцией хронического воспалительного ответа (GO:0002676), фосфорилированием IκB (GO:1903721) и синтезом полиненасыщенных жирных кислот (GO:0006636), по словарю GO:MF – с активностью ацил-КоА-десатураз (GO:0016215) и стероил-КоА-десатураз (GO:0004768), а по словарю GO:CC – с третичными (GO:0070820) и специфическими гранулами (GO:0035579). Далее, при анализе ДЭГов с повышенной транскрипционной активностью с помощью базы данных KEGG PATHWAY было выявлено их ассоциация с биосинтезом полиненасыщенных жирных кислот (KEGG:01040) и метаболизмом холестерина (KEGG:04979) (рис. 14).



Рисунок 14. Функциональная аннотация ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью у клеток THP-1 в ВПК по словарям базы данных «Генная онтология» (GO) и KEGG PATHWAY. Словарь биологические процессы (GO:BP), словарь клеточные компоненты (GO:CC), словарь молекулярные функции (GO:MF). * - $FDR \leq 0,05$; ** - $FDR \leq 0,01$.

Исходя из вышесказанного, ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью, в основном ассоциированы с активацией провоспалительных сигнальных путей и ферментов, а также с синтезом полиненасыщенных жирных кислот, являющихся предшественниками медиаторов воспаления, таких как эйкозаноиды (Calder, 2020).

Далее было показано, что по словарю GO:BP ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью были ассоциированы с трансмембранным транспортом ионов цинка (GO:0071582), по словарю GO:MF – с активностью рецепторов галанина (GO:0031763) и связыванием лептомицина В (GO:1901707), а по словарю GO:CC – с транспортом аминокислот (GO:1990184) и везикул комплекса Гольджи (GO:0070319). При анализе ДЭГ с пониженной

транскрипционной активностью с помощью базы данных KEGG PATHWAY было выявлена ассоциация с транспортом неорганических ионов (KEGG:04978) (рис. 15).



Рисунок 15. Обогащение ДЭГ с сниженной экспрессией для категорий биологических процессов (BP) – голубой, клеточных компонентов (CC) – желтый, молекулярных функций (MF) – зеленый согласно GO. Обогащение путей по категориям KEGG – красный, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

То есть, ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью, в основном ассоциированы с развитием противовоспалительного ответа, известными активаторами которого являются ионы цинка и лептомицин В (Downton et al., 2023; Jarosz et al., 2017).

Далее для идентификации взаимодействий между продуктами ДЭГ и конкретными ДЭГ, определяющих эти взаимодействия, с помощью базы данных STRINGdb (Szklarczyk et al., 2019), были построены сети белок-белковых взаимодействий (PPI) для ДЭГ с повышенной и пониженной транскрипционной активностью. Было показано, что среди 92 ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью 38 генов образовывали общую сеть взаимодействий, включающую 2 кластера генов, объединяемых единственным геном TNF, имеющим наибольшее количество взаимодействий. Ген TNF кодирует плейотропный цитокин ФНО-

альфа, известный активатор провоспалительных сигнальных путей (рис. 16а) (Webster, Vucic, 2020).

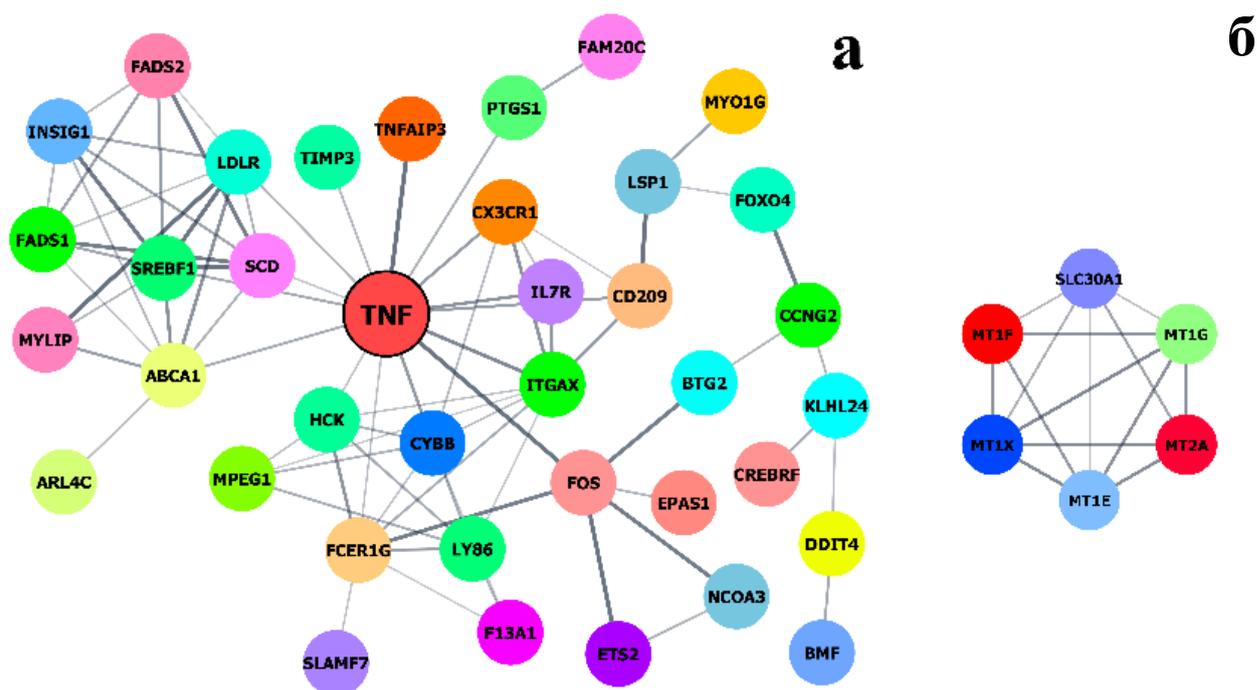


Рисунок 16. Сети молекулярного взаимодействия продуктов генов с повышенной (а) и пониженной (б) экспрессией.

При анализе взаимодействий между продуктами ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью, было показано, что из 29 ДЭГов единую сеть взаимодействий образуют 6 генов, относящихся к семейству белков металлотионеинов, контролирующих гомеостаз цинка, участников противовоспалительного ответа (рис. 16б) (Jarosz et al., 2017).

Хорошо известно, что цитокин ФНО-альфа регулирует внутриклеточные сигнальные каскады путем активации транскрипционного фактора NF-κB, под транскрипционным контролем которого находится множество провоспалительных и антиапоптотических генов, что особенно важно в контексте повышения резистентности к TRAIL-индуцированной гибели (Yu et al., 2020). Поэтому далее, для идентификации транскрипционной активности сигнальных путей, был проведен анализ обогащения наборов генов (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) (Subramanian et al., 2005). Для этого были выбраны набор генов, продукты которого, образуют сигнальный путь ФНО-альфа зависимой активации NF-κB (TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB), коллекции Hallmark и

наборы генов, содержащих последовательности для связывания с транскрипционным фактором NF-kB, субколлекции TFT_LEGACY, коллекции TFT базы данных MSigDB (Molecular Signatures Database) (Liberzon et al., 2011). Целесообразность данного подхода основана на том, что в GSEA анализируются не только ДЭГ, а вся совокупность транскрибируемых генов, что в свою очередь, позволяет оценить изменения (активацию/деактивацию) сразу всего исследуемого сигнального пути или всех исследуемых генов-мишеней независимо от изменения их транскрипционной активности (Subramanian et al., 2005). Было показано, что у клеток в ВПК по отношению к НПК происходит обогащение набора генов TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB, что отражает активность сигнального пути ФНО-альфа зависимой активации NF-kB (рис. 17а). Также у клеток в высокоплотной культуре было показано обогащение всех наборов генов, содержащих последовательности для связывания с NF-kB, отражающее суммарную активацию их транскрипционной активности (рис. 17б).

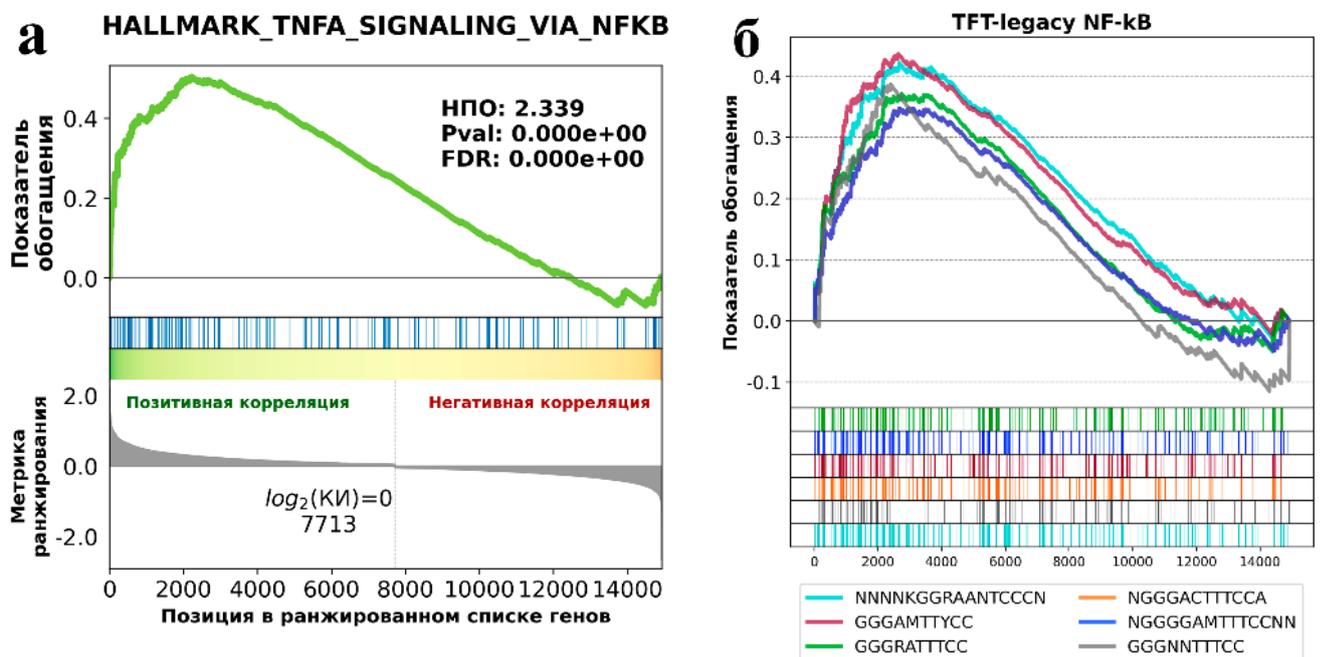


Рисунок 17. GSEA анализ набора генов TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB (а) и наборов генов, содержащих последовательности для связывания с NF-kB (б), где N - любой нуклеотид, K - G или T/U, R - A/G, M - A/C, Y - C или T/U. FDR \leq 0,05.

Таким образом, у клеток ОМЛ ТНР-1 в ВПК происходит активация внутриклеточных провоспалительных сигнальных и метаболических путей, регулируемых ФНО-альфа, посредством NF-кВ-опосредованной транскрипции.

3.3 Сравнительный анализ сигнального пути TRAIL в клетках высокоплотных и низкоплотных культур.

Одной из основных причин повышения устойчивости опухолевых клеток к TRAIL-индуцированной гибели считается снижение поверхностной экспрессии проапоптотических рецепторов TRAILR1/DR4 и TRAILR2/DR5, а также повышение поверхностной экспрессии антиапоптотических рецепторов TRAILR3/DcR1 и TRAILR4/DcR2 (Ralff, El-Deiry, 2018). Поэтому мы исследовали поверхностную экспрессию про- и антиапоптотических TRAIL-рецепторов у клеток ОМЛ ТНР-1 в высокоплотной культуре (ВПК), с помощью проточной цитометрии. Так как выше представленные данные показывают, что у клеток ОМЛ ТНР-1 в ВПК активированы внутриклеточные провоспалительные сигнальные пути, в качестве положительного контроля провоспалительной активации клетки ОМЛ обрабатывали липополисахаридом (ЛПС).

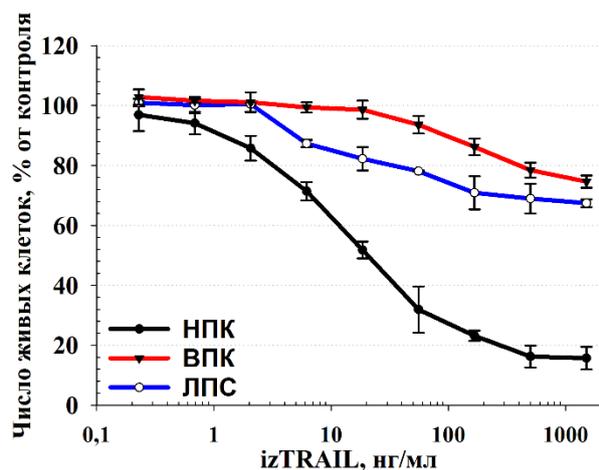


Рисунок 18. Цитотоксическое действие белка izTRAIL на клетки линии ТНР-1 через 24 (НПК), 120 (ВПК) часов и обработанные липополисахаридом (ЛПС). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 10$).

Клетки ТНР-1 в культурах низкой плотности, обработанные ЛПС, обладали повышенной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели (рис. 18).

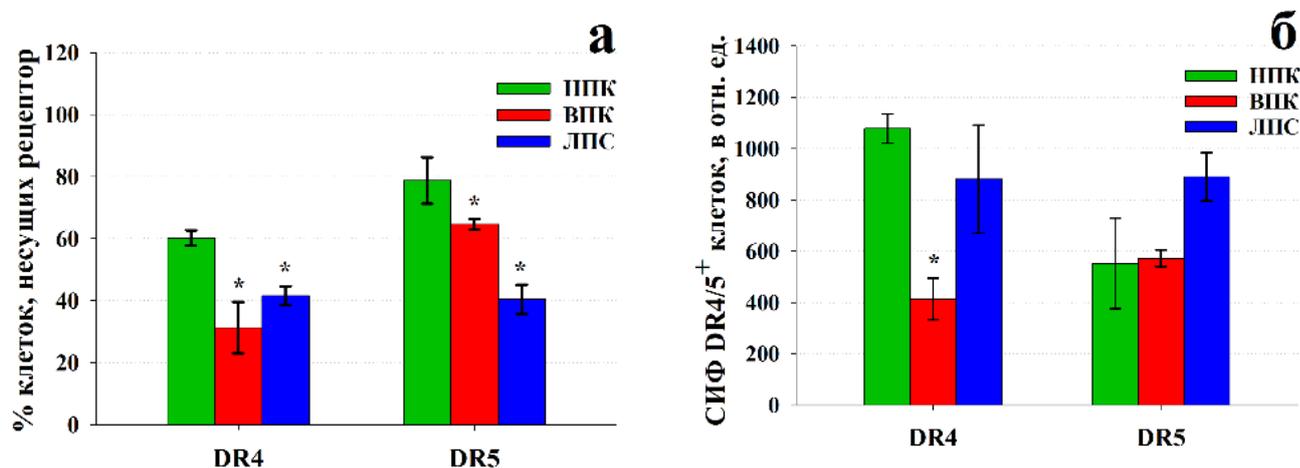


Рисунок 19. Анализ количества DR4/5-позитивных клеток (а) и поверхностной экспрессии DR4/5 (б) в ВПК клеток ТНР-1 по сравнению с НПК и клетками, обработанными ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками ТНР-1 в НПК.

Было показано, что в культуре высокой плотности (ВПК) клеток ОМЛ ТНР-1 количество DR4-позитивных клеток составляло $31 \pm 8\%$ в отличие от культуры низкой плотности (НПК), где количество DR4-позитивных клеток было $60 \pm 2,4\%$. Кроме этого, в ВПК количество DR5-позитивных клеток ТНР-1 было достоверно ($p \leq 0,05$) ниже чем в НПК, $65 \pm 4,8\%$ и $80 \pm 5,5\%$, соответственно. Схожие результаты были получены при обработке клеток ЛПС (рис. 19а).

Также, было показано, что у DR4-позитивных клеток, но не у DR5-позитивных клеток в ВПК происходило достоверное ($p \leq 0,05$) снижение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных соответствующими антителами, по сравнению с НПК, что указывает на уменьшение количества соответствующих рецепторов на внешней клеточной мембране. В случае с клетками, обработанными ЛПС, такого эффекта обнаружено не было (рис. 19б). При анализе поверхностной экспрессии антиапоптотических TRAIL-рецепторов - DcR1 и DcR2, наличие данных рецепторов на поверхности клеток ТНР-1, как в ВПК, так в НПК и после обработки ЛПС, обнаружено не было.

Далее мы провели анализ внутриклеточного содержания известных цитоплазматических адапторных белков-партнеров проапоптотических TRAIL-рецепторов, таких как FADD (активатор апоптоза), прокаспаза-8 (активатор

апоптоза) и cFLIP (ингибитор апоптоза) (Razeghian et al., 2021). Было показано, что у клеток ТНР-1 в ВПК, по сравнению с НПК происходит уменьшение содержания белка FADD, увеличение содержания прокаспазы-8, а также уменьшение содержания длинной формы белка cFLIP_L, не препятствующей аутокатализу каспазы-8 и повышение содержания короткой формы белка cFLIP_S, препятствующей аутокатализу прокаспазы-8 (Smyth et al., 2020). Сходные изменения в содержании исследуемых белков были показаны для клеток, обработанных ЛПС (рис. 20).

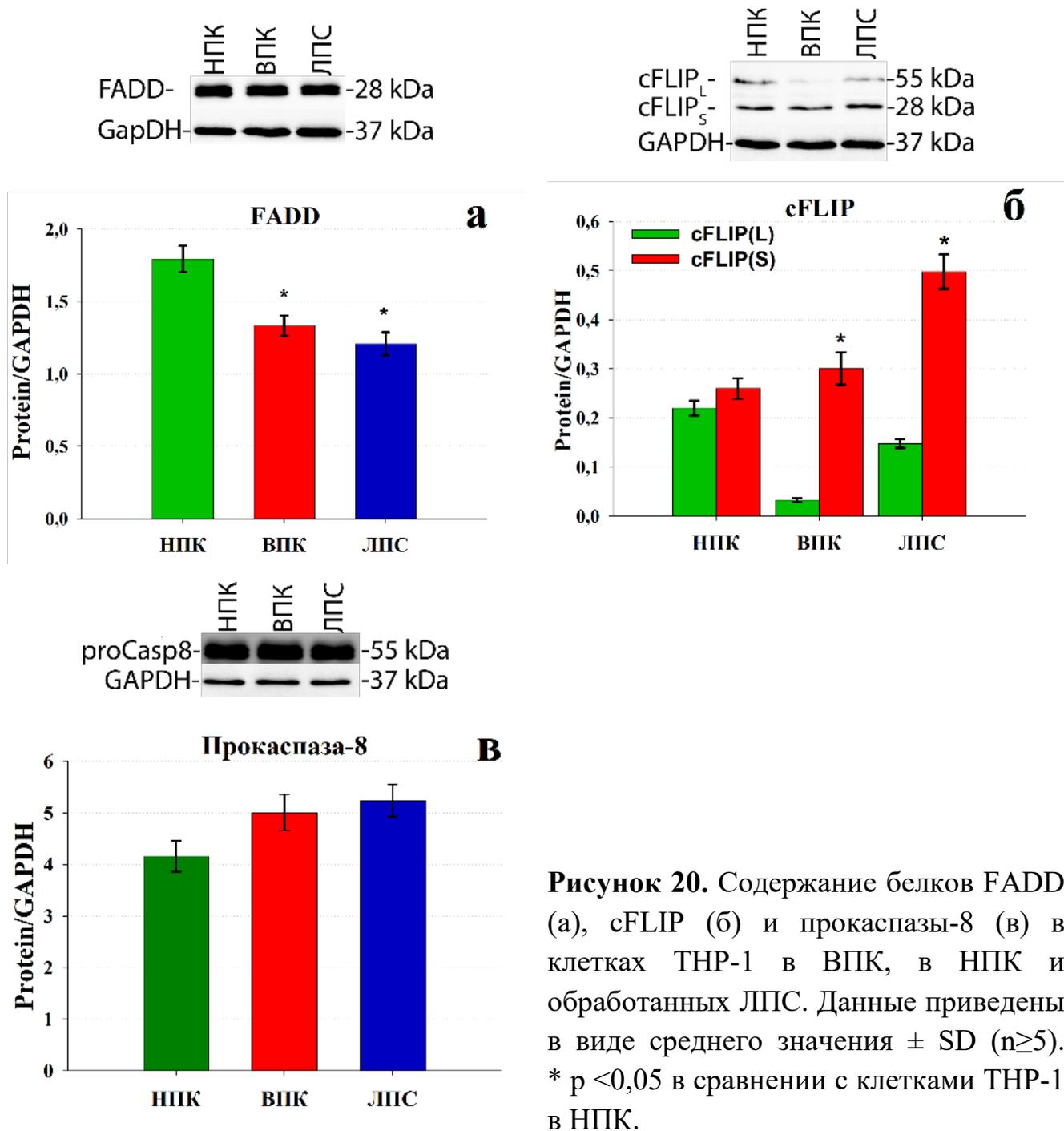


Рисунок 20. Содержание белков FADD (а), cFLIP (б) и прокаспазы-8 (в) в клетках THP-1 в BPK, в HPK и обработанных ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками THP-1 в HPK.

Далее мы исследовали TRAIL-индуцированную активацию прокаспазы-8 у клеток в BPK. Для этого клетки THP-1 в BPK, в HPK и клетки, обработанные ЛПС инкубировали с 100 нг/мл izTRAIL в течении 1 и 2 часов и проводили оценку образования активной каспазы-8 (p18) и ключевого маркера активности каспазы-8 усеченной формы белка Bid – tBid (truncated Bid), известного активатора выхода цитохрома С и сборки апоптосомы (Flores-Romero et al., 2022).

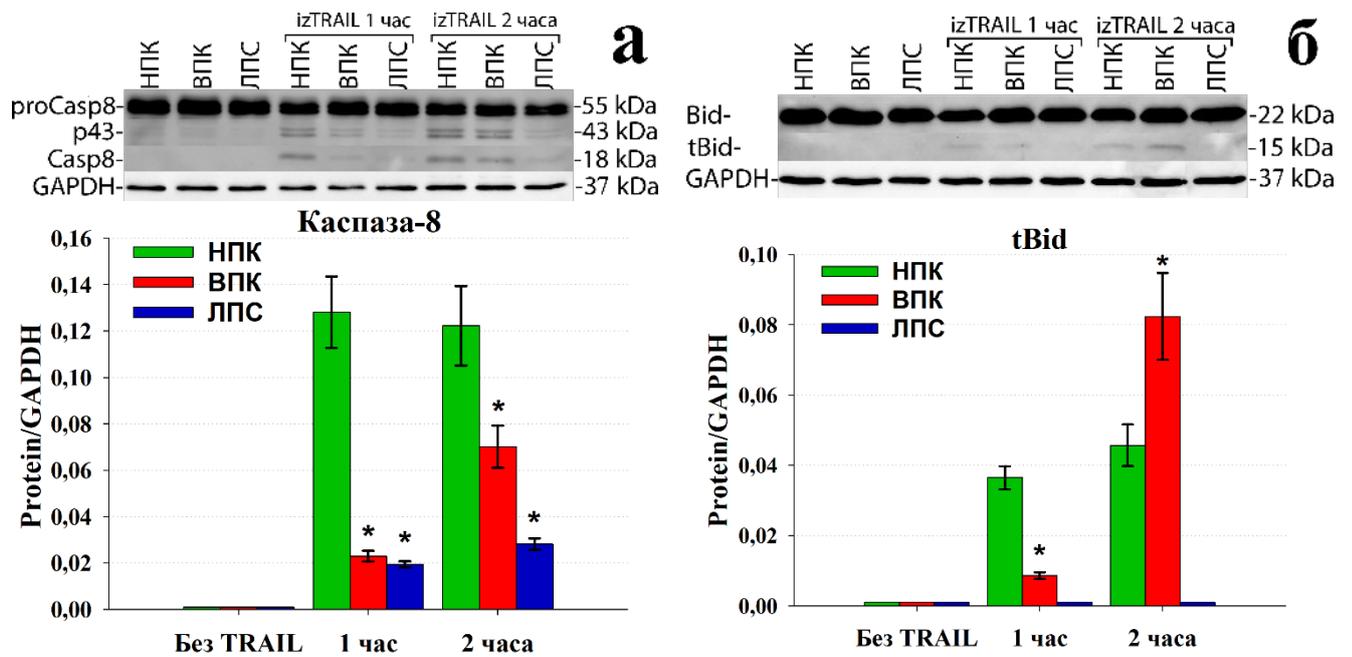


Рисунок 21. Анализ TRAIL-индуцированного образования активной каспазы-8 (а) и усеченной формы белка Bid (б) у клеток THP-1 в ВПК, в НПК и у клеток, обработанных ЛПС.

TRAIL-резистентной культуре (ВПК) через 1 и 2 часа инкубации с izTRAIL начинается образование активной каспазы-8 (p18) и усеченной формы белка Bid – tBid. В случае клеток, обработанных ЛПС, инкубация с izTRAIL приводила к образованию крайне малого количества активной каспазы-8, но не формы tBid (рис. 21а, б). В тоже время, у клеток THP-1 в ВПК, как и в случае клеток, обработанных ЛПС, незначительно увеличивалась TRAIL-индуцированная активность эффекторных каспаз-3/7 (рис. 22а). Количество клеток содержащих неактивную форму поли(АДФ-рибоза)-полимеразы cPARP(Asp214), известного маркера апоптоза (Mashimo et al., 2021), в течение 8 часов инкубации с izTRAIL, в ВПК увеличилась до 16 ± 3 %, в НПК до 61 ± 4 % и у клеток, обработанных ЛПС повышалось до $12 \pm 2,5$ % (рис. 22б). Через 24 часа инкубации количество cPARP(Asp214)-позитивных клеток в ВПК не изменялось, составляло 18 ± 4 %, у клеток, обработанных ЛПС, составляло 13 ± 2 %.

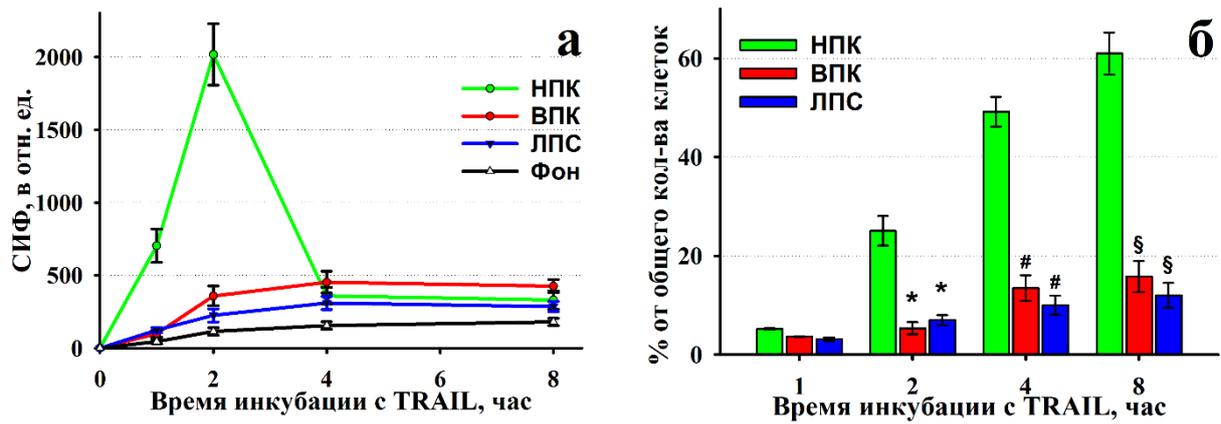


Рисунок 22. Оценка активности каспаз-3/7 (а) и содержания cPARP(Asp214) позитивных клеток THP-1 в ВПК, в НПК и у клеток, обработанных ЛПС, при инкубации с 100 нг/мл izTRAIL. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками THP-1 в НПК.

Таким образом, у клеток ОМЛ THP-1 в высокоплотной TRAIL-резистентной культуре (ВПК) показано снижение содержания проапоптотического адаптерного белка FADD и повышение антиапоптотического белка cFLIPS. В тоже время, при инкубации клеток в ВПК с izTRAIL, происходила активация каспазы-8 и образование активной формы (tBid) проапоптотического белка Bid. Однако активность эффекторных каспаз-3/7 в этих условиях изменялась не значительно. То есть у клеток в ВПК происходила TRAIL-индуцируемая активация апоптотического сигнала, которая существенно ингибировалась на уровне эффекторных каспаз.

Хорошо известно, что каспаза 8 может индуцировать апоптотический каскад как за счет прямого процессинга эффекторных каспаз-3/7, так и опосредованно, через tBid-зависимую сборку апосомы с активацией каспазы-9, с последующим процессингом каспаз-3/7 (Han et al., 2021). В связи с тем, что при инкубации с izTRAIL у клеток ОМЛ THP-1 в высокоплотной TRAIL-резистентной культуре происходила активация каспазы-8 и образование tBid, но

не существенное повышение активности каспаз-3/7, мы предположили, что данный эффект может быть связан с непосредственным ингибированием как активности каспаз-3/7, так и сборки апоптосомы. Основными внутриклеточными ингибиторами панкаспазной активности являются белки семейства IAP (BIRC), образующие комплексы с каспазами, с последующей их протеосомальной деградацией (Estornes, Bertrand, 2015). Поэтому, мы исследовали экспрессию всех членов семейства IAP у клеток ОМЛ ТНР-1 в ВПК и у клеток, обработанных ЛПС по сравнению с клетками в НПК, с помощью ОТ-ПЦР. Было показано, что у клеток в ВПК происходило достоверное увеличение ($p \leq 0,05$) в $4,8 \pm 1,5$ раза экспрессии Livin, ингибитора каспаз 3, 7 и 9 (Kim et al., 2021), по сравнению с клетками в НПК. В тоже время для клеток, обработанных ЛПС показано увеличение в $43 \pm 2,5$ раза экспрессии cIAP2, ингибитора каспаз-3, -7, -8 и -10 (Mohamed и др., 2017), по сравнению с клетками в НПК (рис. 23а).

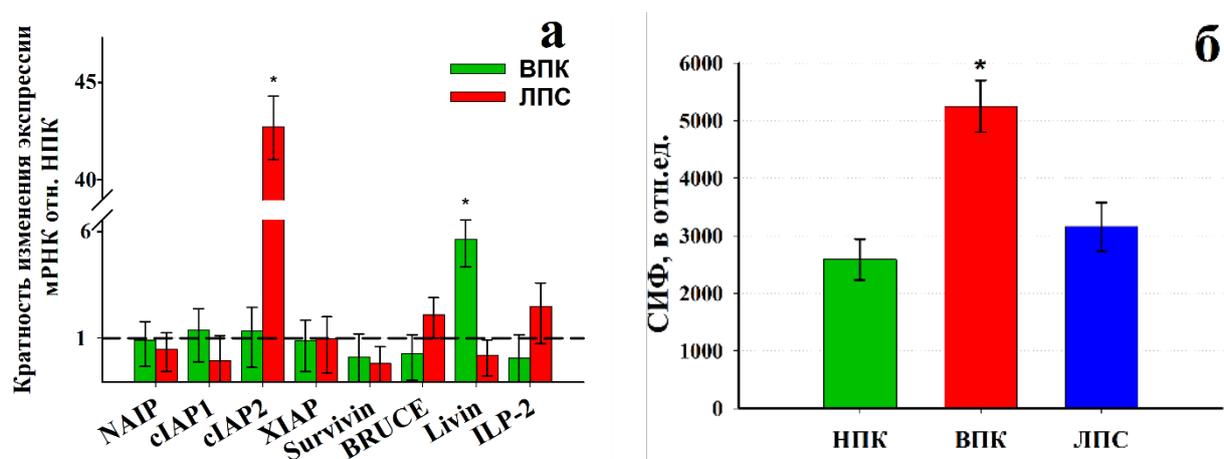


Рисунок 23. Оценка экспрессии мРНК генов семейства IAP (BIRC) (а) и внутриклеточного содержания антиапоптотического белка Bcl-2 у клеток ТНР-1 в ВПК и у клеток, обработанных ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками ТНР-1 в НПК.

Дополнительно, у клеток ОМЛ ТНР-1 в ВПК, в НПК и у клеток, обработанных ЛПС, с помощью проточной цитометрии, мы оценили внутриклеточное содержание белка Bcl-2, известного ингибитора выхода

цитохрома С и сборки апоптосомы (Alam et al., 2021). Было показано, что у клеток в высокоплотной, TRAIL-резистентной культуре (ВПК), происходило увеличение содержания белка Bcl-2. В случае с клетками, обработанными ЛПС, данного эффекта мы не обнаружили (рис. 23б).

Таким образом, в высокоплотной, TRAIL-резистентной культуре клеток ОМЛ ТНР-1 происходит повышение экспрессии Livin, ингибитора активации каспаз-3, -7 и -9, а также повышение внутриклеточного содержания антиапоптотического белка Bcl-2, ингибитора выхода цитохрома С и сборки апоптосомы.

3.5 Оценка возможности подавления устойчивости клеток миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели в высокоплотных культурах.

Учитывая тот факт, что повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели связано с развитием воспалительноподобной реакции, была проведена оценка возможности снижения устойчивости клеток миелоидного лейкоза ТНР-1 ВПК к действию izTRAIL при применении стероидных (дексаметазон, преднизолон) и нестероидных (диклофенак, индометацин) противовоспалительных соединений (рис. 24). Несмотря на сообщения различных групп авторов о повышении чувствительности к различным вариантам терапии при использовании как стероидных, так и нестероидных противовоспалительных препаратов, их применение за 24 часа перед использованием TRAIL для ТНР-1 ВПК не привело к значимым результатам (Cuzick et al., 2009; He et al., 2017; Khanzadeh et al., 2018).

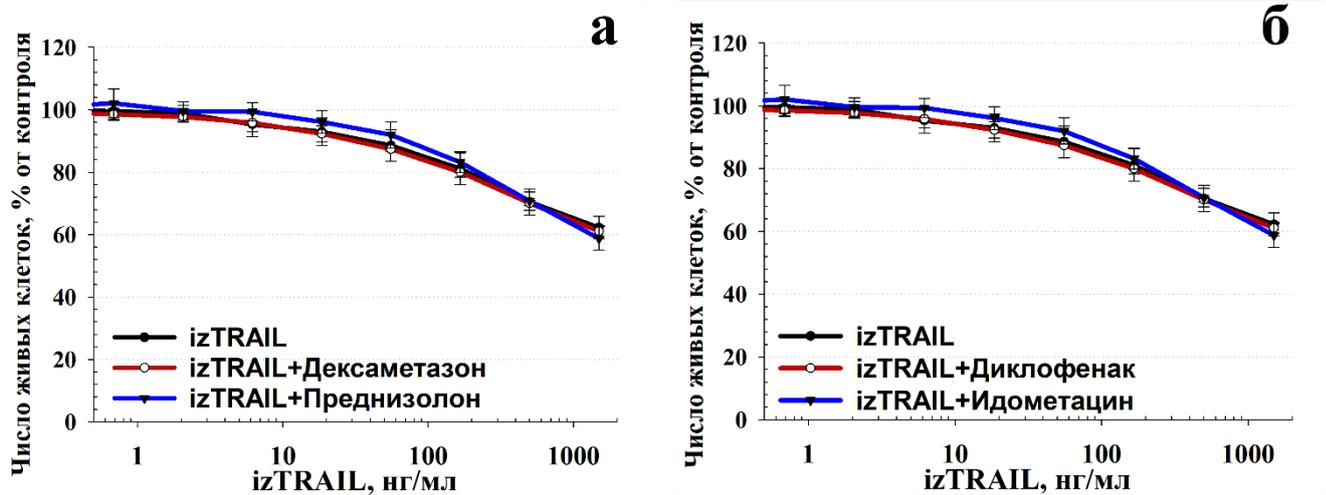


Рисунок 24. Оценка возможности подавления TRAIL-устойчивости клеток ТНР-1 в высокоплотных культурах при использовании стероидных (а) и нестероидных (б) противовоспалительных препаратов. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 10$).

Так как воспалительный ответ, согласно результатам биоинформатического анализа, реализуется через транскрипционный фактор NF- κ B, была проведена оценка возможности подавления устойчивости к действию izTRAIL при применении таргетных, NF- κ B-ориентированных, (QNZ, NF- κ B-Activation Inhibitor IV, JSH-23) противовоспалительных соединений, а также ВНЗ миметика Navitoclax (ингибитор Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w). Для этого клетки ТНР-1 в ВПК предварительно инкубировали в течение 4 часов с данными ингибиторами, после чего обрабатывали izTRAIL в течение 20 часов.

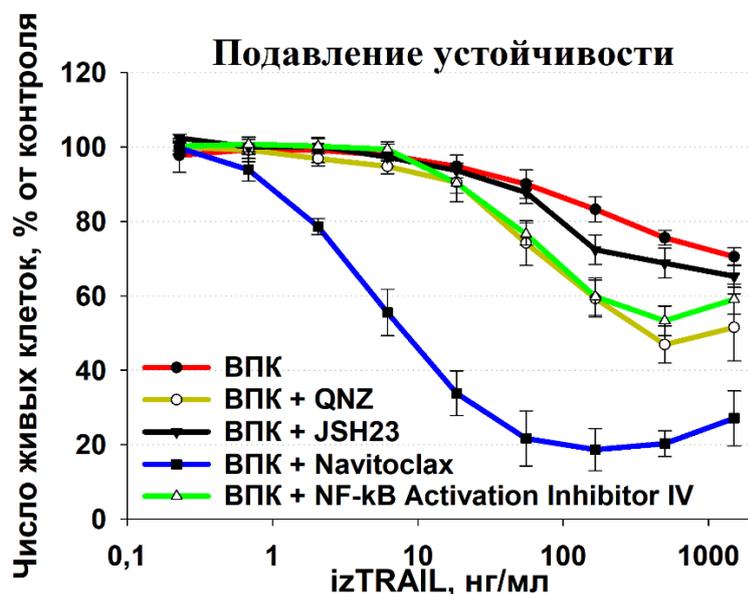


Рисунок 24. Оценка возможности подавления TRAIL-устойчивости клеток ТНР-1 в высокоплотных культурах ингибиторами активации (зеленая и желтая линии), и транслокации (черная линия) NF- κ B, а также ВНЗ миметиком Navitoclax (синяя линия). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 10$).

В результате проведенного исследования было показано, что ингибитор транслокации транскрипционного фактора NF- κ B (JSH-23) не оказывали влияния на TRAIL-резистентность клеток ТНР-1 ВПК. Ингибиторы активации транскрипционного фактора NF- κ B (QNZ, NF- κ B-Activation Inhibitor IV) снижали устойчивость клеток в ВПК к действию izTRAIL, и наиболее эффективно TRAIL-резистентность снижалась при применении ВНЗ миметика Navitoclax (рис. 22).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопление клеток ОМЛ в костном мозге формирует уникальное микроокружение, способствующее не только прогрессии заболевания, но и формированию устойчивости к действию терапии (Skelding et al., 2022). В таких условиях существенно изменяется не только активность оставшихся здоровых гемопоэтических клеток, но также и протекторные функции иммунокомпетентных клеток (Pimenta et al., 2021). Особый интерес вызывает вопрос как накопление «опухолевой массы» в весьма ограниченном пространстве костного мозга, может воздействовать на активность противоопухолевого иммунитета, прежде всего с точки зрения его возможной фармакологической коррекции. Цитокин TRAIL, как элемент противоопухолевого надзора, в организме человека выполняет основную эффекторную функцию - элиминацию злокачественно трансформированных клеток, путем запуска контролируемой клеточной гибели (Alizadeh Zeinabad, Szegezdi, 2022). Однако, в настоящее время, крайне малое количество исследований посвящено на изучении особенностей функционирования молекулярных и клеточных эффекторов противоопухолевого иммунитета в условиях специфического микроокружения, опосредуемого накоплением «опухолевой массы».

На основании полученных нами данных на рисунке 26 представлен гипотетический механизм повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах, имитирующих накопление лейкозных клеток в пространстве костного мозга. В высокоплотных, TRAIL-резистентных культурах (ВПК) у клеток ОМЛ происходит ФНО-альфа регулируемая, посредством NF- κ B-опосредованной транскрипции, активация внутриклеточных провоспалительных сигнальных и метаболических путей. На фоне провоспалительной активации у клеток ОМЛ в ВПК происходит снижение поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4/5 и содержания внутриклеточного проапоптотического адаптерного белка FADD, а также увеличение короткой формы антиапоптотического белка cFLIP_s.

Интересно, что у клеток, обработанных ЛПС, классическим провоспалительным активатором, мы увидели сходные изменения в сигнальном пути TRAIL.

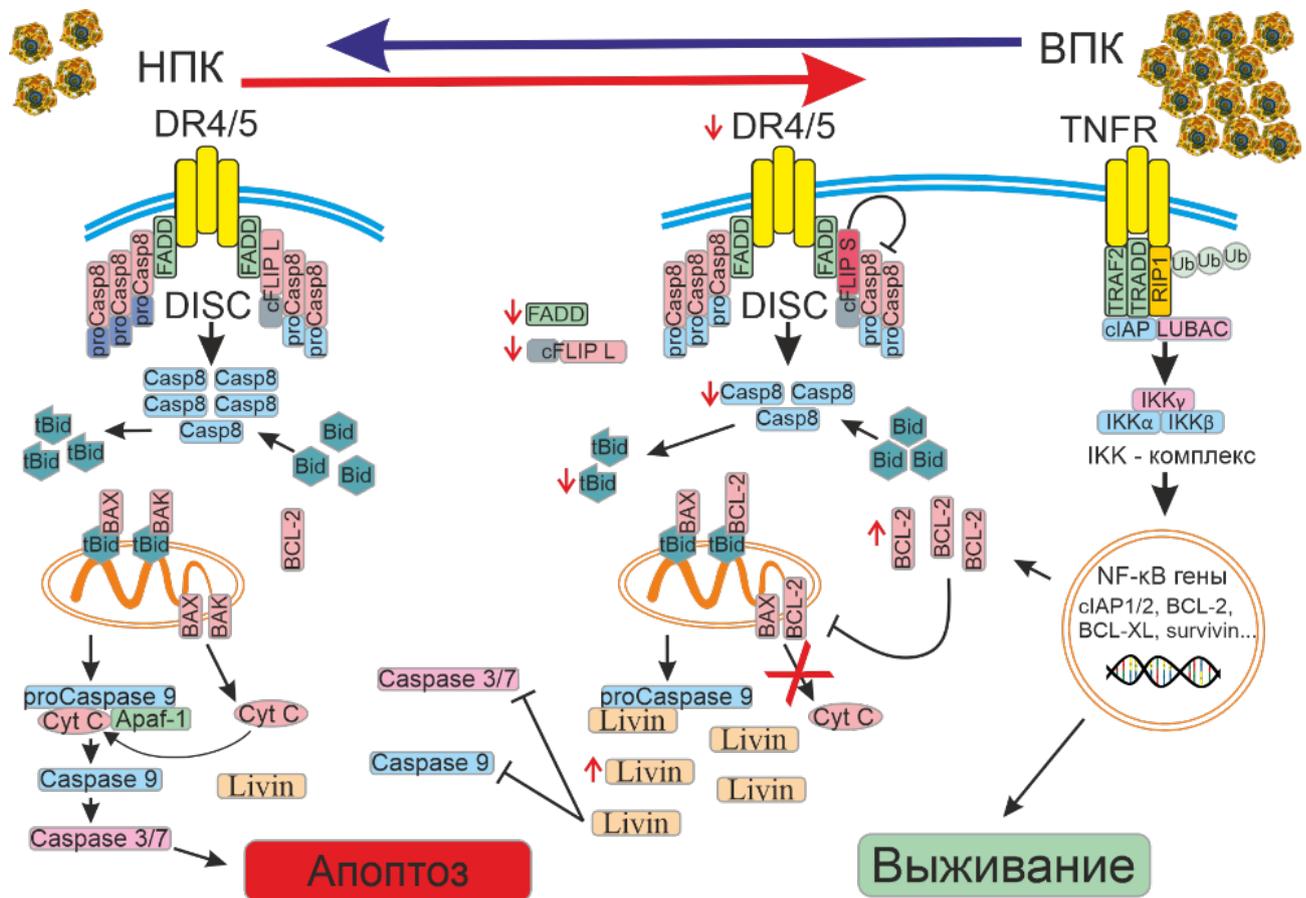


Рисунок 26. Гипотетический механизм повышения резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу у клеток ОМЛ THP-1 в трехмерных культурах высокой плотности.

В тоже время, у клеток ОМЛ в высокоплотных, TRAIL-резистентных культурах при инкубации с izTRAIL инициировалось образование активной каспазы-8 и активатора сборки апоптосомы, укороченной формы tBid, в отличие от клеток, обработанных ЛПС, где такого эффекта мы не наблюдали. Однако мы обнаружили не значительное повышение TRAIL-индуцированной активности эффекторных каспаз-3/7 и незначительное образование cPARP (Asp214) у клеток ОМЛ в ВПК, что свидетельствует об отсутствии развития TRAIL-индуцированного апоптоза. Мы связываем это с увеличением экспрессии ингибитора эффекторных каспаз Livin и ингибитора выхода цитохрома С и

сборки апоптосомы белка Bcl-2 у клеток ОМЛ в ВПК. В случае с клетками, обработанными ЛПС ингибирование TRAIL-индуцированного апоптоза происходит на начальном этапе, путем блокирования активации инициаторных каспаз-8/10, за счет многократно возросшей экспрессией cIAP2.

Полученные результаты представляют интерес как для исследования основных сигнальных путей, изменяющихся в опухолевых клетках, так и для понимания молекулярных механизмов уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора, а также показывают принципиальную возможность коррекции устойчивости опухолевых клеток к медиаторам противоопухолевого иммунитета.

ВЫВОДЫ

1. У клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности происходит обратимое повышение резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу.
2. Повышение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах непосредственно не связано с увеличением количества клеток и ограничениями доступа к клеткам.
3. Повышение TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах регулируется активацией TNF-NF- κ B зависимых сигнальных путей и реализуется при участии антиапоптотических белков Bcl-2 и Livin.
4. Резистентность клеток ОМЛ к TRAIL- индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности подавляется ВНЗ миметиком Navitoclax.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПК – высокоплотные культуры

КИ – кратность изменения

КМ – костный мозг

МОБ – минимальной остаточной болезни

МПЦ – многопараметрическая проточная цитометрия

НМРЛ – немелкоклеточный рак лёгкого

НПК – низкоплотные культуры

ОЛСФ - Острый лейкоз смешанного фенотипа

ОМЛ - Острый миелоидный лейкоз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФНО, TNF – фактор некроза опухоли, tumor necrosis factor

ВIR – бакуловиральный IAP повтор

CAR – химерный антигенный рецептор

DD – death domain, домен смерти

DISC – death-inducing signaling complex, сигнальный комплекс индуцирующий смерть

EGF – эпидермальный фактор роста

ELN – European LeukemiaNet

FAB – франко-американо-британская классификация лейкозов

FADD – Fas-ассоциированный домен смерти

FLIP – белок ингибирующий FADD-подобный IL-1P-превращающий фермент

IAP – белок ингибирующий апоптоз

IBM – IAP-связывающий мотив

PI3K – фосфатидилинозитид-3-киназа

PKC – протеинкиназа C

PMA – фобол-12-миристан-13-ацетат

rhTRAIL – рекомбинантный

Smac – второй митохондриальный ингибитор каспаз

Src – нерецепторная тирозинкиназа

TBST – трис-буферный физиологический раствор с добавлением полисорбата 20

TNF – tumor necrosis factor

TRADD – TNF-ассоциированный домен смерти

TRAIL – TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand, ФНО- α ассоциированный апоптоз индуцирующий лиганд

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабкина И. И. Роль транскрипционного фактора NF-κB в нейровоспалении / И. И. Бабкина, С. П. Сергеева, Л. Р. Горбачева // Нейрохимия. – 2021. – Т. 38. – № 2. – С. 111–126.
2. Захаров С. Г. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелобластного лейкоза в многоклеточных агрегатах *in vitro* / С. Г. Захаров, А. К. Голенков, Т. А. Митина, Т. Д. Луцкая, К. Белоусов Александрович, Р. С. Фадеев, М. Е. Соловьева, А. С. Сенотов, В. С. Акатов // Альманах клинической медицины. – 2014. – № 31. – С. 11–16.
3. Кобякова М. И. Появление признаков дифференцировки и провоспалительного фенотипа у клеток острого миелоидного лейкоза TNP-1 при повышении их TRAIL-резистентности в агрегатах *in vitro* / М. И. Кобякова, Я. В. Евстратова, А. С. Сенотов, А. И. Ломовский, В. В. Минайчев, А. И. Звягина, М. Е. Соловьева, И. С. Фадеева, В. С. Акатов, Р. С. Фадеев // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2021. – Т. 38. – № 1. – С. 61–70.
4. Национальное общество детских гематологов и онкологов. Клинические рекомендации «Острые миелоидные лейкозы» / Национальное общество детских гематологов и онкологов. – 2020.
5. Паровичникова Е. Н. Клинический протокол ОМЛ-01.10 по лечению острых миелоидных лейкозов взрослых / Е. Н. Паровичникова // Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / В. Г. Савченко ред. . – Москва : Практика, 2012. – Программное лечение заболеваний крови. – С. 153–207.
6. Савченко В. Г. Острые лейкозы / В. Г. Савченко, Е. Н. Паровичникова // Клиническая онкогематология: руководство для врачей / М. А. Волкова ред. . – Москва, 2007. – С. 409–502.
7. Фадеев Р. С. Резистентность опухолевых клеток к TRAIL–индуцированному апоптозу в конфлюентных культурах : Диссертация на

соискание ученой степени кандидата биологических наук / Р. С. Фадеев. – Пушкино : ИТЭБ РАН, 2012. – 117 с.

8. Фадеев Р. С. Клеточная агрегация повышает лекарственную устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза / Р. С. Фадеев, М. Е. Соловьева, Д. А. Слядовский, С. Г. Захаров, И. С. Фадеева, А. С. Сенотов, Н. В. Долгих, А. К. Голенков, В. С. Акатов // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2015. – Т. 32. – № 2.

9. Downton P. Overexpression of I κ B α modulates NF- κ B activation of inflammatory target gene expression / P. Downton, J. S. Bagnall, H. England, D. G. Spiller, N. E. Humphreys, D. A. Jackson, P. Paszek, M. R. H. White, A. D. Adamson // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2023. – Т. 10. – С. 1187187.

10. Webster J. D. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues / J. D. Webster, D. Vucic // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – Т. 8. – С. 365.

11. Alam M. B Cell Lymphoma 2: A Potential Therapeutic Target for Cancer Therapy / M. Alam, S. Ali, T. Mohammad, G. M. Hasan, D. K. Yadav, Md. I. Hassan // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 19. – P. 10442.

12. Alizadeh Zeinabad H. TRAIL in the Treatment of Cancer: From Soluble Cytokine to Nanosystems / H. Alizadeh Zeinabad, E. Szegezdi // Cancers. – 2022. – Vol. 14. – № 20. – P. 5125.

13. Almasan A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy / A. Almasan, A. Ashkenazi // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2003. – Vol. 14. – № 3–4. – P. 337–348.

14. Appelbaum F. R. Age and acute myeloid leukemia / F. R. Appelbaum, H. Gundacker, D. R. Head, M. L. Slovak, C. L. Willman, J. E. Godwin, J. E. Anderson, S. H. Petersdorf // Blood. – 2006. – Vol. 107. – № 9. – P. 3481–3485.

15. Arber D. A. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D. A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola, J. W. Vardiman // Blood. – 2016. – Vol. 127. – № 20. – P. 2391–2405.

16. Ashkenazi A. Ligand-Based Targeting of Apoptosis in Cancer: The Potential of Recombinant Human Apoptosis Ligand 2/Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand (rhApo2L/TRAIL) / A. Ashkenazi, P. Holland, S. G. Eckhardt // *Journal of Clinical Oncology*. – 2008. – Vol. 26. – № 21. – P. 3621–3630.
17. Ashkenazi A. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand / A. Ashkenazi, R. C. Pai, S. Fong, S. Leung, D. A. Lawrence, S. A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A. E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I. L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh, R. H. Schwall // *Journal of Clinical Investigation*. – 1999. – Vol. 104. – № 2. – P. 155–162.
18. Austin C. D. Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis / C. D. Austin, D. A. Lawrence, A. A. Peden, E. E. Varfolomeev, K. Totpal, A. M. De Mazière, J. Klumperman, D. Arnott, V. Pham, R. H. Scheller, A. Ashkenazi // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 27. – P. 10283–10288.
19. Azijli K. Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3 dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells / K. Azijli, S. Yuvaraj, M. P. Peppelenbosch, T. Würdinger, H. Dekker, J. Joore, E. Van Dijk, W. J. Quax, G. J. Peters, S. De Jong, F. A. E. Kruyt // *Journal of Cell Science*. – 2012. – P. jcs.109587.
20. Bader-Meunier B. Occurrence of myeloproliferative disorder in patients with Noonan syndrome / B. Bader-Meunier, G. Tchernia, F. Miélot, J. L. Fontaine, C. Thomas, S. Lyonnet, J. M. Lavergne, J. P. Dommergues // *The Journal of Pediatrics*. – 1997. – Vol. 130. – № 6. – P. 885–889.
21. Bagnoli M. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: A key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer / M. Bagnoli, S. Canevari, D. Mezzanzanica // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2010. – Vol. 42. – № 2. – P. 210–213.
22. Balkwill F. Inflammation and cancer: back to Virchow? / F. Balkwill, A. Mantovani // *The Lancet*. – 2001. – Vol. 357. – Inflammation and cancer. – № 9255. – P. 539–545.

23. Barbone D. Mammalian Target of Rapamycin Contributes to the Acquired Apoptotic Resistance of Human Mesothelioma Multicellular Spheroids / D. Barbone, T.-M. Yang, J. R. Morgan, G. Gaudino, V. C. Broaddus // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 19. – P. 13021–13030.
24. Behbakht K. Six1 Overexpression in Ovarian Carcinoma Causes Resistance to TRAIL-Mediated Apoptosis and Is Associated with Poor Survival / K. Behbakht, L. Qamar, C. S. Aldridge, R. D. Coletta, S. A. Davidson, A. Thorburn, H. L. Ford // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – № 7. – P. 3036–3042.
25. Behrmann L. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look / L. Behrmann, J. Wellbrock, W. Fiedler // *Frontiers in Oncology*. – 2018. – Vol. 8. – P. 444.
26. Belyanskaya L. L. TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8 / L. L. Belyanskaya, A. Ziogas, S. Hopkins-Donaldson, S. Kurtz, H.-U. Simon, R. Stahel, U. Zangemeister-Wittke // *Lung Cancer*. – 2008. – Vol. 60. – № 3. – P. 355–365.
27. Benjamini Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing / Y. Benjamini, Y. Hochberg // *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. – 1995. – Vol. 57. – № 1. – P. 289–300.
28. Bennett J. M. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group / J. M. Bennett, D. Catovsky, M.-T. Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. R. Gralnick, C. Sultan // *British Journal of Haematology*. – 1976. – Vol. 33. – № 4. – P. 451–458.
29. Berghe T. V. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways / T. V. Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak, P. Vandenabeele // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2014. – Vol. 15. – № 2. – P. 135–147.

30. Binder S. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators / S. Binder, M. Luciano, J. Horejs-Hoeck // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2018. – Vol. 43. – P. 8–15.
31. Bleicken S. Dynamic Interaction of cBid with Detergents, Liposomes and Mitochondria / S. Bleicken, A. J. García-Sáez, E. Conte, E. Bordignon // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 4. – P. e35910.
32. Bleicken S. Quantitative interactome of a membrane Bcl-2 network identifies a hierarchy of complexes for apoptosis regulation / S. Bleicken, A. Hantusch, K. K. Das, T. Frickey, A. J. Garcia-Saez // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 73.
33. Bodmer J.-L. Cysteine 230 Is Essential for the Structure and Activity of the Cytotoxic Ligand TRAIL / J.-L. Bodmer, P. Meier, J. Tschopp, P. Schneider // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – № 27. – P. 20632–20637.
34. Bozza W. P. Cytokeratin 8/18 protects breast cancer cell lines from TRAIL-induced apoptosis / W. P. Bozza, Y. Zhang, B. Zhang // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 33. – P. 23264–23273.
35. Brivio S. Tumor reactive stroma in cholangiocarcinoma: The fuel behind cancer aggressiveness / S. Brivio, M. Cadamuro, M. Strazzabosco, L. Fabris // *World Journal of Hepatology*. – 2017. – Vol. 9. – № 9. – P. 455.
36. Budhidarmo R. The Ubiquitin-associated Domain of Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins Facilitates Ubiquitylation / R. Budhidarmo, C. L. Day // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 37. – P. 25721–25736.
37. Calder P. C. Eicosanoids / P. C. Calder // *Essays in Biochemistry*. – 2020. – Vol. 64. – № 3. – P. 423–441.
38. Caliceti P. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates / P. Caliceti // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2003. – Vol. 55. – № 10. – P. 1261–1277.
39. Calvo E. First-in-human study of ABBV-621 in patients (pts) with previously treated solid tumours: Dose-optimization cohorts / E. Calvo, M. J. A. De Jonge, D. W. Rasco, V. Moreno, Y.-W. Chang, M. Chiney, M. Motwani, S. Penugonda,

A. M. Petrich, M. J. Ratain, P. LoRusso // *Annals of Oncology*. – 2019. – Vol. 30. – P. v169–v170.

40. Campbell K. J. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer / K. J. Campbell, S. W. G. Tait // *Open Biology*. – 2018. – Vol. 8. – № 5. – P. 180002.

41. Cha S.-S. 2.8 Å Resolution Crystal Structure of Human TRAIL, a Cytokine with Selective Antitumor Activity / S.-S. Cha, M.-S. Kim, Y. H. Choi, B.-J. Sung, N. K. Shin, H.-C. Shin, Y. C. Sung, B.-H. Oh // *Immunity*. – 1999. – Vol. 11. – № 2. – P. 253–261.

42. Chan F. K.-M. Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling / F. K.-M. Chan // *Cytokine*. – 2007. – Vol. 37. – № 2. – P. 101–107.

43. Chang D. W. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation / D. W. Chang // *The EMBO Journal*. – 2003. – Vol. 22. – № 16. – P. 4132–4142.

44. Chang L. Mammalian MAP kinase signalling cascades / L. Chang, M. Karin // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – № 6824. – P. 37–40.

45. Chao Y. Engineering a Dimeric Caspase-9: A Re-evaluation of the Induced Proximity Model for Caspase Activation / Y. Chao, E. N. Shiozaki, S. M. Srinivasula, D. J. Rigotti, R. Fairman, Y. Shi // *PLoS Biology*. – 2005. – Vol. 3. – № 6. – P. e183.

46. Cheah C. Y. Dulanermin with rituximab in patients with relapsed indolent B-cell lymphoma: an open-label phase 1b/2 randomised study / C. Y. Cheah, D. Belada, M. A. Fanale, A. Janikova, M. S. Czucman, I. W. Flinn, A. V. Kapp, A. Ashkenazi, S. Kelley, G. L. Bray, S. Holden, J. F. Seymour // *The Lancet Haematology*. – 2015. – Vol. 2. – № 4. – P. e166–e174.

47. Chen J.-J. Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells / J.-J. Chen, H.-C. J. Shen, L. A. Rivera Rosado, Y. Zhang, X. Di, B. Zhang // *Oncotarget*. – 2012a. – Vol. 3. – № 8. – P. 833–842.

48. Chen W. Recombinant Circularly Permuted TRAIL (CPT) for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: An Open-Label, Multicenter

Phase II Clinical Trial / W. Chen, L. Qiu, J. Hou, Y. Zhao, L. Pan, S. Yang, Y. Leng, H. Xi, X. Zhang, J. Cui, N. Wei // *Blood*. – 2012b. – Vol. 120. – № 21. – P. 78–78.

49. Chen W. Induction of death receptor 5 and suppression of survivin contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer cells / W. Chen, X. Wang, J. Zhuang, L. Zhang, Y. Lin // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol. 28. – № 10. – P. 2114–2121.

50. Ching N. S. Trailing TRAIL Resistance for Targeted Cancer Therapy / N. S. Ching // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. – 2018. – Vol. 4. – № 1.

51. Chinnaiyan A. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis / A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V. M. Dixit // *Cell*. – 1995. – Vol. 81. – № 4. – P. 505–512.

52. Choo M.-K. Blockade of transforming growth factor- β -activated kinase 1 activity enhances TRAIL-induced apoptosis through activation of a caspase cascade / M.-K. Choo, N. Kawasaki, P. Singhirunnusorn, K. Koizumi, S. Sato, S. Akira, I. Saiki, H. Sakurai // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2006. – Vol. 5. – № 12. – P. 2970–2976.

53. Chuntharapai A. Isotype-Dependent Inhibition of Tumor Growth In Vivo by Monoclonal Antibodies to Death Receptor 4 / A. Chuntharapai, K. Dodge, K. Grimmer, K. Schroeder, S. A. Marsters, H. Koeppen, A. Ashkenazi, K. J. Kim // *The Journal of Immunology*. – 2001. – Vol. 166. – № 8. – P. 4891–4898.

54. Clancy L. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis / L. Clancy, K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M. J. Lenardo, F. K.-M. Chan // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – № 50. – P. 18099–18104.

55. Coletta R. D. Six1 Overexpression in Mammary Cells Induces Genomic Instability and Is Sufficient for Malignant Transformation / R. D. Coletta, K. L. Christensen, D. S. Micalizzi, P. Jedlicka, M. Varella-Garcia, H. L. Ford // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 7. – P. 2204–2213.

56. Corazza N. TRAIL receptor-mediated JNK activation and Bim phosphorylation critically regulate Fas-mediated liver damage and lethality / N. Corazza, S. Jakob, C. Schaer, S. Frese, A. Keogh, D. Stroka, D. Kassahn, R. Torgler, C. Mueller, P. Schneider, T. Brunner // *Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – Vol. 116. – № 9. – P. 2493–2499.
57. Crusz S. M. Inflammation and cancer: advances and new agents / S. M. Crusz, F. R. Balkwill // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 12. – № 10. – P. 584–596.
58. Cursi S. Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression / S. Cursi, A. Rufini, V. Stagni, I. Condò, V. Matafora, A. Bachi, A. P. Bonifazi, L. Coppola, G. Superti-Furga, R. Testi, D. Barilà // *The EMBO Journal*. – 2006. – Vol. 25. – № 9. – P. 1895–1905.
59. Cuzick J. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement / J. Cuzick, F. Otto, J. A. Baron, P. H. Brown, J. Burn, P. Greenwald, J. Jankowski, C. La Vecchia, F. Meyskens, H. J. Senn, M. Thun // *The Lancet Oncology*. – 2009. – Vol. 10. – № 5. – P. 501–507.
60. Dai X. Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy / X. Dai, J. Zhang, F. Arfuso, A. Chinnathambi, M. Zayed, S. A. Alharbi, A. P. Kumar, K. S. Ahn, G. Sethi // *Experimental Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 240. – № 6. – P. 760–773.
61. Dawson S.-J. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications / S.-J. Dawson, O. M. Rueda, S. Aparicio, C. Caldas // *The EMBO Journal*. – 2013. – Vol. 32. – № 5. – P. 617–628.
62. De Miguel D. High-order TRAIL oligomer formation in TRAIL-coated lipid nanoparticles enhances DR5 cross-linking and increases antitumour effect against colon cancer / D. De Miguel, A. Gallego-Lleyda, J. M. Ayuso, D. Pejenaute-Ochoa, V. Jarauta, I. Marzo, L. J. Fernández, I. Ochoa, B. Conde, A. Anel, L. Martinez-Lostao // *Cancer Letters*. – 2016. – Vol. 383. – № 2. – P. 250–260.

63. De Toni E. N. P60-c-src suppresses apoptosis through inhibition of caspase 8 activation in hepatoma cells, but not in primary hepatocytes / E. N. De Toni, C. Kuntzen, A. L. Gerbes, W. E. Thasler, N. Sonuc, S. R. Mucha, P. Camaj, C. Bruns, B. Göke, S. T. Eichhorst // *Journal of Hepatology*. – 2007. – Vol. 46. – № 4. – P. 682–691.
64. Degli-Esposti M. A. The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain / M. A. Degli-Esposti, W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith, R. G. Goodwin // *Immunity*. – 1997. – Vol. 7. – № 6. – P. 813–820.
65. Degtarev A. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins / A. Degtarev, J. Hitomi, M. Germscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X. Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, S. M. Hedrick, S. A. Gerber, A. Lugovskoy, J. Yuan // *Nature Chemical Biology*. – 2008. – Vol. 4. – № 5. – P. 313–321.
66. Delbridge A. R. D. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy / A. R. D. Delbridge, A. Strasser // *Cell Death & Differentiation*. – 2015. – Vol. 22. – № 7. – P. 1071–1080.
67. Deng D. TRAIL of Hope Meeting Resistance in Cancer / D. Deng, K. Shah // *Trends in Cancer*. – 2020. – Vol. 6. – № 12. – P. 989–1001.
68. Di X. Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5 / X. Di, G. Zhang, Y. Zhang, K. Takeda, L. A. R. Rosado, B. Zhang // *Oncotarget*. – 2013. – Vol. 4. – № 9. – P. 1349–1364.
69. Dillon R. How we use molecular minimal residual disease (MRD) testing in acute myeloid leukaemia (AML) / R. Dillon, N. Potter, S. Freeman, N. Russell // *British Journal of Haematology*. – 2021. – Vol. 193. – № 2. – P. 231–244.
70. Ding L. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing / L. Ding, T. J. Ley, D. E. Larson, C. A. Miller, D. C. Koboldt, J. S. Welch, J. K. Ritchey, M. A. Young, T. Lamprecht, M. D. McLellan, J. F. McMichael, J. W. Wallis, C. Lu, D. Shen, C. C. Harris, D. J. Dooling, R. S. Fulton, L. L. Fulton, K. Chen, H. Schmidt, J. Kalicki-Veizer, V. J. Magrini, L. Cook, S. D. McGrath, T. L. Vickery, M. C. Wendl, S. Heath, M. A. Watson, D. C. Link, M. H.

Tomasson, W. D. Shannon, J. E. Payton, S. Kulkarni, P. Westervelt, M. J. Walter, T. A. Graubert, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. F. DiPersio // *Nature*. – 2012. – Vol. 481. – № 7382. – P. 506–510.

71. Dobson C. L. Human monomeric antibody fragments to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 that display potent in vitro agonism / C. L. Dobson, S. Main, P. Newton, M. Chodorge, K. Cadwallader, R. C. Humphreys, V. Albert, T. J. Vaughan, R. R. Minter, B. M. Edwards // *mAbs*. – 2009. – Vol. 1. – № 6. – P. 552–562.

72. Döhner H. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel / H. Döhner, E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Büchner, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, R. A. Larson, R. L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, H.-F. Tien, A. H. Wei, B. Löwenberg, C. D. Bloomfield // *Blood*. – 2017. – Vol. 129. – № 4. – P. 424–447.

73. Döhner H. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN / H. Döhner, A. H. Wei, F. R. Appelbaum, C. Craddock, C. D. DiNardo, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, L. A. Godley, R. P. Hasserjian, R. A. Larson, R. L. Levine, Y. Miyazaki, D. Niederwieser, G. Ossenkoppele, C. Röllig, J. Sierra, E. M. Stein, M. S. Tallman, H.-F. Tien, J. Wang, A. Wierzbowska, B. Löwenberg // *Blood*. – 2022. – Vol. 140. – № 12. – P. 1345–1377.

74. Dubrez L. IAPs and Resistance to Death Receptors in Cancer / L. Dubrez, S. Fulda // *TRAIL, Fas Ligand, TNF and TLR3 in Cancer : Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics* / O. Micheau ed. . – Cham : Springer International Publishing, 2017. – Vol. 12. – P. 59–77.

75. Dubuisson A. Antibodies and Derivatives Targeting DR4 and DR5 for Cancer Therapy / A. Dubuisson, O. Micheau // *Antibodies*. – 2017. – Vol. 6. – № 4. – P. 16.

76. Dueber E. C. Antagonists Induce a Conformational Change in cIAP1 That Promotes Autoubiquitination / E. C. Dueber, A. J. Schoeffler, A. Lingel, J. M. Elliott, A. V. Fedorova, A. M. Giannetti, K. Zobel, B. Maurer, E. Varfolomeev, P. Wu, H. J. A.

Wallweber, S. G. Hymowitz, K. Deshayes, D. Vucic, W. J. Fairbrother // *Science*. – 2011. – Vol. 334. – № 6054. – P. 376–380.

77. Dufour F. N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death / F. Dufour, T. Rattier, S. Shirley, G. Picarda, A. A. Constantinescu, A. Morlé, A. B. Zakaria, G. Marcion, S. Causse, E. Szegezdi, D. M. Zajonc, R. Seigneuric, G. Guichard, T. Gharbi, F. Picaud, G. Herlem, C. Garrido, P. Schneider, C. A. Benedict, O. Micheau // *Cell Death & Differentiation*. – 2017. – Vol. 24. – № 3. – P. 500–510.

78. Emery J. G. Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL / J. G. Emery, P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee, P. R. Young // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 23. – P. 14363–14367.

79. Engesæter B. Ø. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with dacarbazine or TRAIL in melanoma cells / B. Ø. Engesæter, M. Sathermugathevan, T. Hellenes, O. Engebråten, R. Holm, V. A. Flørenes, G. M. Mælandsmo // *Cancer Biology & Therapy*. – 2011. – Vol. 12. – № 1. – P. 47–58.

80. Estornes Y. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation / Y. Estornes, M. J. M. Bertrand // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2015. – Vol. 39. – P. 106–114.

81. Fadeev R. Improved anticancer effect of recombinant protein izTRAIL combined with sorafenib and peptide iRGD / R. Fadeev, A. Chekanov, M. Solovieva, O. Bezborodova, E. Nemtsova, N. Dolgikh, I. Fadeeva, A. Senotov, M. Kobyakova, Y. Evstratova, R. Yakubovskaya, V. Akatov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 3.

82. Fadeev R. S. Increase in resistance of A431 cancer cells to TRAIL-induced apoptosis in confluent cultures / R. S. Fadeev, A. V. Chekanov, N. V. Dolgikh, V. S. Akatov // *Biophysics*. – 2012. – Vol. 57. – № 4.

83. Fang F. Antitumor activity of a novel recombinant mutant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand1 / F. Fang, A. Wang, S. Yang // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2005. – Vol. 26. – № 11. – P. 1373–1381.
84. Farrow B. Activation of Conventional PKC Isoforms Increases Expression of the Pro-Apoptotic Protein Bad and TRAIL Receptors / B. Farrow, R. P. Thomas, X. Wang, B. M. Evers // *International Journal of Gastrointestinal Cancer*. – 2002. – Vol. 32. – № 2–3. – P. 63–72.
85. Feins S. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer / S. Feins, W. Kong, E. F. Williams, M. C. Milone, J. A. Fraietta // *American Journal of Hematology*. – 2019. – Vol. 94. – № S1. – P. S3–S9.
86. Feltham R. Smac Mimetics Activate the E3 Ligase Activity of cIAP1 Protein by Promoting RING Domain Dimerization / R. Feltham, B. Bettjeman, R. Budhidarmo, P. D. Mace, S. Shirley, S. M. Condon, S. K. Chunduru, M. A. McKinlay, D. L. Vaux, J. Silke, C. L. Day // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 19. – P. 17015–17028.
87. Feng S. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain / S. Feng, Y. Yang, Y. Mei, L. Ma, D. Zhu, N. Hoti, M. Castanares, M. Wu // *Cellular Signalling*. – 2007. – Vol. 19. – № 10. – P. 2056–2067.
88. Feoktistova M. cIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms / M. Feoktistova, P. Geserick, B. Kellert, D. P. Dimitrova, C. Langlais, M. Hupe, K. Cain, M. MacFarlane, G. Häcker, M. Leverkus // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 43. – № 3. – P. 449–463.
89. Fleming A. K. Protein kinase C isoforms in the normal pancreas and in pancreatic disease / A. K. Fleming, P. Storz // *Cellular Signalling*. – 2017. – Vol. 40. – P. 1–9.
90. Flores-Romero H. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis / H. Flores-Romero, L. Hohorst, M. John, M. Albert, L. E. King, L.

Beckmann, T. Szabo, V. Hertlein, X. Luo, A. Villunger, L. P. Frenzel, H. Kashkar, A. J. Garcia-Saez // *The EMBO Journal*. – 2022. – Vol. 41. – № 2.

91. Franzen C. A. Matrix Protein CCN1 Is Critical for Prostate Carcinoma Cell Proliferation and TRAIL-Induced Apoptosis / C. A. Franzen, C.-C. Chen, V. Todorović, V. Juric, R. I. Monzon, L. F. Lau // *Molecular Cancer Research*. – 2009. – Vol. 7. – № 7. – P. 1045–1055.

92. Fulda S. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression / S. Fulda, E. Meyer, K.-M. Debatin // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – № 15. – P. 2283–2294.

93. Galluzzi L. Molecular mechanisms of regulated necrosis / L. Galluzzi, O. Kepp, S. Krautwald, G. Kroemer, A. Linkermann // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2014. – Vol. 35. – P. 24–32.

94. García-Sáez A. J. Membrane promotes tBID interaction with BCLXL / A. J. García-Sáez, J. Ries, M. Orzáez, E. Pérez-Payà, P. Schulle // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 16. – № 11. – P. 1178–1185.

95. Gasparian M. E. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5 / M. E. Gasparian, B. V. Chernyak, D. A. Dolgikh, A. V. Yagolovich, E. N. Popova, A. M. Sycheva, S. A. Moshkovskii, M. P. Kirpichnikov // *Apoptosis*. – 2009. – Vol. 14. – № 6. – P. 778–787.

96. Ge S. X. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data / S. X. Ge, E. W. Son, R. Yao // *BMC Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 534.

97. Gillespie S. Variable expression of protein kinase C ϵ in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis / S. Gillespie, X. D. Zhang, P. Hersey // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2005. – Vol. 4. – № 4. – P. 668–676.

98. Graves J. D. Apo2L/TRAIL and the Death Receptor 5 Agonist Antibody AMG 655 Cooperate to Promote Receptor Clustering and Antitumor Activity / J. D. Graves, J. J. Kordich, T.-H. Huang, J. Piasecki, T. L. Bush, T. Sullivan, I. N. Foltz, W. Chang, H. Douangpanya, T. Dang, J. W. O'Neill, R. Mallari, X. Zhao, D. G.

Branstetter, J. M. Rossi, A. M. Long, X. Huang, P. M. Holland // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 2. – P. 177–189.

99. Grayson K. A. Overcoming TRAIL-resistance by sensitizing prostate cancer 3D spheroids with taxanes / K. A. Grayson, N. Jyotsana, N. Ortiz-Otero, M. R. King // *PLOS ONE*. – 2021. – Vol. 16. – № 3. – P. e0246733.

100. Gross A. Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death / A. Gross, X.-M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. J. Korsmeyer // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – № 2. – P. 1156–1163.

101. Han J.-H. Regulation of Caspase-8 Activity at the Crossroads of Pro-Inflammation and Anti-Inflammation / J.-H. Han, J. Park, T.-B. Kang, K.-H. Lee // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 7. – P. 3318.

102. Harper N. Protein Kinase C Modulates Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis by Targeting the Apical Events of Death Receptor Signaling / N. Harper, M. A. Hughes, S. N. Farrow, G. M. Cohen, M. MacFarlane // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 45. – P. 44338–44347.

103. Hatok J. Bcl-2 family proteins: master regulators of cell survival / J. Hatok, P. Racay // *Biomolecular Concepts*. – 2016. – Vol. 7. – № 4. – P. 259–270.

104. He J. Dexamethasone affects cell growth/apoptosis/chemosensitivity of colon cancer via glucocorticoid receptor α /NF- κ B / J. He, J. Zhou, W. Yang, Q. Zhou, X. Liang, X. Pang, J. Li, F. Pan, H. Liang // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 40. – P. 67670–67683.

105. He Y. Melanoma-Directed Activation of Apoptosis Using a Bispecific Antibody Directed at MCSP and TRAIL Receptor-2/Death Receptor-5 / Y. He, D. Hendriks, R. Van Ginkel, D. Samplonius, E. Bremer, W. Helfrich // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2016. – Vol. 136. – № 2. – P. 541–544.

106. He Y. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy / Y. He, M. M. Sun, G. G. Zhang, J. Yang, K. S. Chen, W. W. Xu, B. Li // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 425.

107. He Z. Cell membrane-coated nanosized active targeted drug delivery systems homing to tumor cells: A review / Z. He, Y. Zhang, N. Feng // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – Vol. 106. – P. 110298.

108. Hendriks D. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1)-targeted TRAIL combines PD-L1-mediated checkpoint inhibition with TRAIL-mediated apoptosis induction / D. Hendriks, Y. He, I. Koopmans, V. R. Wiersma, R. J. Van Ginkel, D. F. Samplonius, W. Helfrich, E. Bremer // *OncoImmunology*. – 2016. – Vol. 5. – № 8. – P. e1202390.

109. Herbst R. S. Phase I Dose-Escalation Study of Recombinant Human Apo2L/TRAIL, a Dual Proapoptotic Receptor Agonist, in Patients With Advanced Cancer / R. S. Herbst, S. G. Eckhardt, R. Kurzrock, S. Ebbinghaus, P. J. O'Dwyer, M. S. Gordon, W. Novotny, M. A. Goldwasser, T. M. Tohny, B. L. Lum, A. Ashkenazi, A. M. Jubb, D. S. Mendelson // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28. – № 17. – P. 2839–2846.

110. Heride C. Ubiquitin code assembly and disassembly / C. Heride, S. Urbé, M. J. Clague // *Current Biology*. – 2014. – Vol. 24. – № 6. – P. R215–R220.

111. Herr I. JNK/SAPK activity contributes to TRAIL-induced apoptosis / I. Herr, D. Wilhelm, E. Meyer, I. Jeremias, P. Angel, K.-M. Debatin // *Cell Death & Differentiation*. – 1999. – Vol. 6. – № 2. – P. 130–135.

112. Hirata E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy / E. Hirata, E. Sahai // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2017. – Vol. 7. – № 7. – P. a026781.

113. Hu W.-H. Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Receptors Signal NF- κ B and JNK Activation and Apoptosis through Distinct Pathways / W.-H. Hu, H. Johnson, H.-B. Shu // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – № 43. – P. 30603–30610.

114. Huang Y. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain / Y. Huang, Y. C. Park, R. L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka, H. Wu // *Cell*. – 2001. – Vol. 104. – № 5. – P. 781–790.
115. Hussain A. R. XIAP over-expression is an independent poor prognostic marker in Middle Eastern breast cancer and can be targeted to induce efficient apoptosis / A. R. Hussain, A. K. Siraj, M. Ahmed, R. Bu, P. Pratheeshkumar, A. M. Alrashed, Z. Qadri, D. Ajarim, F. Al-Dayel, S. Beg, K. S. Al-Kuraya // *BMC Cancer*. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 640.
116. Hymowitz S. G. Triggering Cell Death / S. G. Hymowitz, H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi, A. M. de Vos // *Molecular Cell*. – 1999. – Vol. 4. – № 4. – P. 563–571.
117. Hymowitz S. G. A Unique Zinc-Binding Site Revealed by a High-Resolution X-ray Structure of Homotrimeric Apo2L/TRAIL / S. G. Hymowitz, M. P. O'Connell, M. H. Ultsch, A. Hurst, K. Totpal, A. Ashkenazi, A. M. de Vos, R. F. Kelley // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39. – № 4. – P. 633–640.
118. Imashuku S. A review of 125 cases to determine the risk of myelodysplasia and leukemia in pediatric neutropenic patients after treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor / S. Imashuku, S. Hibi, F. Nakajima, T. Mitsui, S. Yokoyama, S. Kojima, T. Matsuyama, T. Nakahata, K. Ueda, I. Tsukimoto // *Blood*. – 1994. – Vol. 84. – № 7. – P. 2380–2381.
119. Irmeler M. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP / M. Irmeler, M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.-L. Bodmer, M. Schröter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, J. Tschopp // *Nature*. – 1997. – Vol. 388. – № 6638. – P. 190–195.
120. Jarosz M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling / M. Jarosz, M. Olbert, G. Wyszogrodzka, K. Młyniec, T. Librowski // *Inflammopharmacology*. – 2017. – Vol. 25. – № 1. – P. 11–24.
121. Jennewein C. Identification of a novel pro-apoptotic role of NF- κ B in the regulation of TRAIL- and CD95-mediated apoptosis of glioblastoma cells / C.

Jennewein, S. Karl, B. Baumann, O. Micheau, K.-M. Debatin, S. Fulda // *Oncogene*. – 2012. – Vol. 31. – № 11. – P. 1468–1474.

122. Jeong G. M. High-level production of Fc-fused kringle domain in *Pichia pastoris* / G. M. Jeong, Y. J. Lee, Y. S. Kim, K. J. Jeong // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 41. – № 6. – P. 989–996.

123. Jin Z. Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling / Z. Jin, Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V. C. Pham, J. R. Lill, A. Ashkenazi // *Cell*. – 2009. – Vol. 137. – № 4. – P. 721–735.

124. Joensuu H. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer / H. Joensuu, L. Pylkkänen, S. Toikkanen // *The American Journal of Pathology*. – 1994. – Vol. 145. – № 5. – P. 1191–1198.

125. Kalafati L. Innate Immune Training of Granulopoiesis Promotes Anti-tumor Activity / L. Kalafati, I. Kourtzelis, J. Schulte-Schrepping, X. Li, A. Hatzioannou, T. Grinenko, E. Hagag, A. Sinha, C. Has, S. Dietz, A. M. De Jesus Domingues, M. Nati, S. Sormendi, A. Neuwirth, A. Chatzigeorgiou, A. Ziogas, M. Lesche, A. Dahl, I. Henry, P. Subramanian, B. Wielockx, P. Murray, P. Mirtschink, K.-J. Chung, J. L. Schultze, M. G. Netea, G. Hajishengallis, P. Verginis, I. Mitroulis, T. Chavakis // *Cell*. – 2020. – Vol. 183. – № 3. – P. 771-785.e12.

126. Kale J. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death / J. Kale, E. J. Osterlund, D. W. Andrews // *Cell Death & Differentiation*. – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 65–80.

127. Kallenberger S. M. Intra- and Interdimeric Caspase-8 Self-Cleavage Controls Strength and Timing of CD95-Induced Apoptosis / S. M. Kallenberger, J. Beaudouin, J. Claus, C. Fischer, P. K. Sorger, S. Legewie, R. Eils // *Science Signaling*. – 2014. – Vol. 7. – № 316.

128. Karstedt S. von. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy / S. von Karstedt, A. Montinaro, H. Walczak // *Nature Reviews Cancer*. – 2017. – Vol. 17. – № 6. – P. 352–366.

129. Khanzadeh T. Investigation of *BAX* and *BCL2* expression and apoptosis in a resveratrol- and prednisolone-treated human T-ALL cell line, CCRF-CEM / T. Khanzadeh, M. F. Hagh, M. Talebi, B. Yousefi, A. Azimi, A. A. Hossein Pour Feizi, B. Baradaran // *Blood Research*. – 2018. – Vol. 53. – № 1. – P. 53.
130. Kim H. Inhibitor of apoptosis protein Livin promotes tumor progression and chemoradioresistance in human anaplastic thyroid cancer / H. Kim, S.-A. Kim, E. Jung, K.-H. Lee, J. Lee, H.-C. Kang, Y.-E. Joo, S. Lim, T. Yoon // *Oncology Reports*. – 2021. – Vol. 45. – № 4. – P. 18.
131. Kobayashi E. A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells / E. Kobayashi, H. Kishi, T. Ozawa, H. Hamana, H. Nakagawa, A. Jin, Z. Lin, A. Muraguchi // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 453. – № 4. – P. 798–803.
132. Korte J. E. The contribution of benzene to smoking-induced leukemia / J. E. Korte, I. Hertz-Picciotto, M. R. Schulz, L. M. Ball, E. J. Duell // *Environmental Health Perspectives*. – 2000. – Vol. 108. – № 4. – P. 333–339.
133. Kulathila R. The structure of the BIR3 domain of cIAP1 in complex with the N-terminal peptides of SMAC and caspase-9 / R. Kulathila, B. Vash, D. Sage, S. Cornell-Kennon, K. Wright, J. Koehn, T. Stams, K. Clark, A. Price // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. – 2009. – Vol. 65. – № 1. – P. 58–66.
134. Lafont E. The linear ubiquitin chain assembly complex regulates TRAIL-induced gene activation and cell death / E. Lafont, C. Kantari-Mimoun, P. Draber, D. De Miguel, T. Hartwig, M. Reichert, S. Kupka, Y. Shimizu, L. Taraborrelli, M. Spit, M. R. Sprick, H. Walczak // *The EMBO Journal*. – 2017. – Vol. 36. – № 9. – P. 1147–1166.
135. Laplane L. Beyond the tumour microenvironment / L. Laplane, D. Duluc, A. Bikfalvi, N. Larmonier, T. Pradeu // *International Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 145. – № 10. – P. 2611–2618.
136. Lavrik I. N. CD95 Stimulation Results in the Formation of a Novel Death Effector Domain Protein-containing Complex / I. N. Lavrik, T. Mock, A. Golks, J. C.

Hoffmann, S. Baumann, P. H. Krammer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 39. – P. 26401–26408.

137. Le Deley M.-C. Risk of Secondary Leukemia After a Solid Tumor in Childhood According to the Dose of Epipodophyllotoxins and Anthracyclines: A Case-Control Study by the Société Française d'Oncologie Pédiatrique / M.-C. Le Deley, T. Leblanc, A. Shamsaldin, M.-A. Raquin, B. Lacour, D. Sommelet, A. Chompret, J.-M. Cayuela, C. Bayle, A. Bernheim, F. de Vathaire, G. Vassal, C. Hill // *Journal of Clinical Oncology*. – 2003. – Vol. 21. – № 6. – P. 1074–1081.

138. Lee M.-W. The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis / M.-W. Lee, S. C. Park, Y. G. Yang, S. O. Yim, H. S. Chae, J.-H. Bach, H. J. Lee, K. Y. Kim, W. B. Lee, S. S. Kim // *FEBS Letters*. – 2002. – Vol. 512. – № 1–3. – P. 313–318.

139. Li H. AML-derived mesenchymal stem cells upregulate CTGF expression through the BMP pathway and induce K562-ADM fusiform transformation and chemoresistance / H. Li, J. Li, J. Cheng, X. Chen, L. Zhou, Z. Li // *Oncology Reports*. – 2019.

140. Li J. Acute myeloid leukemia with t(4;12)(q12;p13): an aggressive disease with frequent involvement of *PDGFRA* and *ETV6* / J. Li, J. Xu, L. V. Abruzzo, G. Tang, S. Li, M. J. You, G. Lu, E. J. Jabbour, Q. Deng, C. E. Bueso-Ramos, L. J. Medeiros, C. C. Yin // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 13. – P. 10987–10994.

141. Li R. Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL / R. Li, H. Yang, D. Jia, Q. Nie, H. Cai, Q. Fan, L. Wan, L. Li, X. Lu // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Vol. 228. – P. 96–106.

142. Liberzon A. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0 / A. Liberzon, A. Subramanian, R. Pinchback, H. Thorvaldsdóttir, P. Tamayo, J. P. Mesirov // *Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 27. – № 12. – P. 1739–1740.

143. Linassier C. Early secondary acute myelogenous leukemia in breast cancer patients after treatment with mitoxantrone, cyclophosphamide, fluorouracil and radiation therapy / C. Linassier, C. Barin, G. Calais, S. Letortorec, J.-L. Brémond, M.

Delain, A. Petit, M.-T. Georget, G. Cartron, N. Raban, L. Benboubker, R. Leloup, C. Binet, J.-P. Lamagnère, P. Colombat // *Annals of Oncology*. – 2000. – Vol. 11. – № 10. – P. 1289–1294.

144. Liu F. The tetravalent anti-DR5 antibody without cross-linking direct induces apoptosis of cancer cells / F. Liu, Y. Si, G. Liu, S. Li, J. Zhang, Y. Ma // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2015. – Vol. 70. – P. 41–45.

145. Liu T. NF- κ B signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.-C. Sun // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2017. – Vol. 2. – № 1. – P. 17023.

146. Liu Z. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain / Z. Liu, C. Sun, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. F. Betz, T. Oost, J. Herrmann, J. C. Wu, S. W. Fesik // *Nature*. – 2000. – Vol. 408. – № 6815. – P. 1004–1008.

147. Llambi F. A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria / F. Llambi, T. Moldoveanu, S. W. G. Tait, L. Bouchier-Hayes, J. Temirov, L. L. McCormick, C. P. Dillon, D. R. Green // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 44. – № 4. – P. 517–531.

148. Locklin R. M. Agonists of TRAIL death receptors induce myeloma cell apoptosis that is not prevented by cells of the bone marrow microenvironment / R. M. Locklin, P. I. Croucher, R. G. G. Russell, C. M. Edwards // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21. – № 4. – P. 805–812.

149. Loeff M. de. Multiple Interactions Between Cancer Cells and the Tumor Microenvironment Modulate TRAIL Signaling: Implications for TRAIL Receptor Targeted Therapy / M. de Loeff, S. de Jong, F. A. E. Kruyt // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1530.

150. Lopez J. CARD-Mediated Autoinhibition of cIAP1's E3 Ligase Activity Suppresses Cell Proliferation and Migration / J. Lopez, S. W. John, T. Tenev, G. J. P. Rautureau, M. G. Hinds, F. Francalanci, R. Wilson, M. Broemer, M. M. Santoro, C. L. Day, P. Meier // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 42. – № 5. – P. 569–583.

151. Love M. I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / M. I. Love, W. Huber, S. Anders // *Genome Biology*. – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. 550.
152. Lu M. XIAP Induces NF- κ B Activation via the BIR1/TAB1 Interaction and BIR1 Dimerization / M. Lu, S.-C. Lin, Y. Huang, Y. J. Kang, R. Rich, Y.-C. Lo, D. Myszk, J. Han, H. Wu // *Molecular Cell*. – 2007. – Vol. 26. – № 5. – P. 689–702.
153. Ma Y. Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells / Y. Ma, S. Adjemian, S. R. Mattarollo, T. Yamazaki, L. Aymeric, H. Yang, J. P. Portela Catani, D. Hannani, H. Duret, K. Steegh, I. Martins, F. Schlemmer, M. Michaud, O. Kepp, A. Q. Sukkurwala, L. Menger, E. Vacchelli, N. Droin, L. Galluzzi, R. Krzysiek, S. Gordon, P. R. Taylor, P. Van Endert, E. Solary, M. J. Smyth, L. Zitvogel, G. Kroemer // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38. – № 4. – P. 729–741.
154. Mahalingam D. Differential activation of JNK1 isoforms by TRAIL receptors modulate apoptosis of colon cancer cell lines / D. Mahalingam, M. Keane, G. Pirianov, H. Mehmet, A. Samali, E. Szegezdi // *British Journal of Cancer*. – 2009. – Vol. 100. – № 9. – P. 1415–1424.
155. Maman S. A history of exploring cancer in context / S. Maman, I. P. Witz // *Nature Reviews Cancer*. – 2018. – Vol. 18. – № 6. – P. 359–376.
156. Manzo F. TNF-related apoptosis-inducing ligand: Signalling of a ‘smart’ molecule / F. Manzo, A. Nebbioso, M. Miceli, M. Conte, F. De Bellis, V. Carafa, G. Franci, F. P. Tambaro, L. Altucci // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2009. – Vol. 41. – № 3. – P. 460–466.
157. McBride M. L. Childhood cancer and environmental contaminants / M. L. McBride // *Canadian Journal of Public Health = Revue Canadienne De Sante Publique*. – 1998. – Vol. 89 Suppl 1. – P. S53-62, S58-68.
158. McGranahan N. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future / N. McGranahan, C. Swanton // *Cell*. – 2017. – Vol. 168. – № 4. – P. 613–628.

159. Medler J. TNFRSF receptor-specific antibody fusion proteins with targeting controlled FcγR-independent agonistic activity / J. Medler, J. Nelke, D. Weisenberger, T. Steinfatt, M. Rothaug, S. Berr, T. Hünig, A. Beilhack, H. Wajant // *Cell Death & Disease*. – 2019. – Vol. 10. – № 3. – P. 224.

160. Mérino D. Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2 / D. Mérino, N. Lalaoui, A. Morizot, P. Schneider, E. Solary, O. Micheau // *Molecular and Cellular Biology*. – 2006. – Vol. 26. – № 19. – P. 7046–7055.

161. Micallef I. N. M. Therapy-Related Myelodysplasia and Secondary Acute Myelogenous Leukemia After High-Dose Therapy With Autologous Hematopoietic Progenitor-Cell Support for Lymphoid Malignancies / I. N. M. Micallef, D. M. Lillington, J. Apostolidis, J. A. L. Amess, M. Neat, J. Matthews, T. Clark, J. M. Foran, A. Salam, T. A. Lister, A. Z. S. Rohatiner // *Journal of Clinical Oncology*. – 2000. – Vol. 18. – № 5. – P. 947–947.

162. Micheau O. NF-κB Signals Induce the Expression of c-FLIP / O. Micheau, S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos, J. Tschopp // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – Vol. 21. – № 16. – P. 5299–5305.

163. Micheau O. Death receptors as targets in cancer: TRAIL clinical trials / O. Micheau, S. Shirley, F. Dufour // *British Journal of Pharmacology*. – 2013. – Vol. 169. – № 8. – P. 1723–1744.

164. Milani D. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sequentially activates pro-survival and pro-apoptotic pathways in SK-N-MC neuronal cells: TRAIL sequentially activates Akt/CREB and caspases / D. Milani, G. Zauli, E. Rimondi, C. Celeghini, S. Marmiroli, P. Narducci, S. Capitani, P. Secchiero // *Journal of Neurochemistry*. – 2004. – Vol. 86. – № 1. – P. 126–135.

165. Mills P. K. Organophosphate pesticide residues in urine of farmworkers and their children in Fresno County, California / P. K. Mills, S. H. Zahm // *American Journal of Industrial Medicine*. – 2001. – Vol. 40. – № 5. – P. 571–577.

166. Miyoshi E. Fucosylation Is a Promising Target for Cancer Diagnosis and Therapy / E. Miyoshi, K. Moriwaki, N. Terao, C.-C. Tan, M. Terao, T. Nakagawa, H.

Matsumoto, S. Shinzaki, Y. Kamada // *Biomolecules*. – 2012. – Vol. 2. – № 1. – P. 34–45.

167. Mohamed M. S. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer / M. S. Mohamed, M. K. Bishr, F. M. Almutairi, A. G. Ali // *Apoptosis*. – 2017. – Vol. 22. – Inhibitors of apoptosis. – № 12. – P. 1487–1509.

168. Mongiat M. Regulation of the Extrinsic Apoptotic Pathway by the Extracellular Matrix Glycoprotein EMILIN2 / M. Mongiat, G. Ligresti, S. Marastoni, E. Lorenzon, R. Doliana, A. Colombatti // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – Vol. 27. – № 20. – P. 7176–7187.

169. Montinaro A. Harnessing TRAIL-induced cell death for cancer therapy: a long walk with thrilling discoveries / A. Montinaro, H. Walczak // *Cell Death & Differentiation*. – 2023. – Vol. 30. – № 2. – P. 237–249.

170. Morioka S. TAK1 kinase determines TRAIL sensitivity by modulating reactive oxygen species and cIAP / S. Morioka, E. Omori, T. Kajino, R. Kajino-Sakamoto, K. Matsumoto, J. Ninomiya-Tsuji // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28. – № 23. – P. 2257–2265.

171. Moriwaki K. Fucosylation and gastrointestinal cancer / K. Moriwaki // *World Journal of Hepatology*. – 2010. – Vol. 2. – № 4. – P. 151.

172. Moriwaki K. The effect of epigenetic regulation of fucosylation on TRAIL-induced apoptosis / K. Moriwaki, M. Narisada, T. Imai, S. Shinzaki, E. Miyoshi // *Glycoconjugate Journal*. – 2010. – Vol. 27. – № 7–9. – P. 649–659.

173. Moriwaki K. Deficiency of GMDS Leads to Escape from NK Cell-Mediated Tumor Surveillance Through Modulation of TRAIL Signaling / K. Moriwaki, K. Noda, Y. Furukawa, K. Ohshima, A. Uchiyama, T. Nakagawa, N. Taniguchi, Y. Daigo, Y. Nakamura, N. Hayashi, E. Miyoshi // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 137. – № 1. – P. 188-198.e2.

174. Moriwaki K. GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMDS) Deficiency Renders Colon Cancer Cells Resistant to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor- and CD95-mediated Apoptosis by Inhibiting Complex II

Formation / K. Moriwaki, S. Shinzaki, E. Miyoshi // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 50. – P. 43123–43133.

175. Morizot A. Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level / A. Morizot, D. Mérino, N. Lalaoui, G. Jacquemin, V. Granci, E. Iessi, D. Lanneau, F. Bouyer, E. Solary, B. Chauffert, P. Saas, C. Garrido, O. Micheau // *Cell Death & Differentiation*. – 2011. – Vol. 18. – № 4. – P. 700–711.

176. Mota A. Intratumor genetic heterogeneity and clonal evolution to decode endometrial cancer progression / A. Mota, S. S. Oltra, P. Selenica, C. P. Moiola, C. Casas-Arozamena, C. López-Gil, E. Diaz, S. Gatus, M. Ruiz-Miro, A. Calvo, A. Rojo-Sebastián, P. Hurtado, R. Piñeiro, E. Colas, A. Gil-Moreno, J. S. Reis-Filho, L. Muínelo-Romay, M. Abal, X. Matias-Guiu, B. Weigelt, G. Moreno-Bueno // *Oncogene*. – 2022. – Vol. 41. – № 13. – P. 1835–1850.

177. Mühlenbeck F. TRAIL/Apo2L Activates c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK) via Caspase-dependent and Caspase-independent Pathways / F. Mühlenbeck, E. Haas, R. Schwenzler, G. Schubert, M. Grell, C. Smith, P. Scheurich, H. Wajant // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 49. – P. 33091–33098.

178. Nathan C. Nonresolving Inflammation / C. Nathan, A. Ding // *Cell*. – 2010. – Vol. 140. – № 6. – P. 871–882.

179. Naval J. Importance of TRAIL Molecular Anatomy in Receptor Oligomerization and Signaling. Implications for Cancer Therapy / J. Naval, D. de Miguel, A. Gallego-Lleyda, A. Anel, L. Martinez-Lostao // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. 444.

180. Ng K. T. Clinicopathological significance of homeoprotein Six1 in hepatocellular carcinoma / K. T. Ng, K. Man, C. K. Sun, T. K. Lee, R. T. Poon, C.-M. Lo, S.-T. Fan // *British Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 95. – № 8. – P. 1050–1055.

181. Nguyen K. MAP3K Family Review and Correlations with Patient Survival Outcomes in Various Cancer Types / K. Nguyen, M. N. Tran, A. Rivera, T. Cheng, G. O. Windsor, A. B. Chabot, J. E. Cavanaugh, B. M. Collins-Burow, S. B. Lee, D. H. Drewry, P. T. Flaherty, M. E. Burow // *Frontiers in Bioscience-Landmark*. – 2022. – Vol. 27. – № 5. – P. 167.

182. Nidai Ozes O. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine–threonine kinase / O. Nidai Ozes, L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer, D. B. Donner // *Nature*. – 1999. – Vol. 401. – № 6748. – P. 82–85.

183. Oberst A. Catalytic activity of the caspase-8–FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis / A. Oberst, C. P. Dillon, R. Weinlich, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, C. Pop, R. Hakem, G. S. Salvesen, D. R. Green // *Nature*. – 2011. – Vol. 471. – № 7338. – P. 363–367.

184. Ofengeim D. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death / D. Ofengeim, J. Yuan // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2013. – Vol. 14. – № 11. – P. 727–736.

185. Olson B. J. S. C. Assays for Determination of Protein Concentration / B. J. S. C. Olson, J. Markwell // *Current Protocols in Pharmacology*. – 2007. – Vol. 38. – № 1.

186. Ouyang X. Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined with vinorelbine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer / X. Ouyang, M. Shi, F. Jie, Y. Bai, P. Shen, Z. Yu, X. Wang, C. Huang, M. Tao, Z. Wang, C. Xie, Q. Wu, Y. Shu, B. Han, F. Zhang, Y. Zhang, C. Hu, X. Ma, Y. Liang, A. Wang, B. Lu, Y. Shi, J. Chen, Z. Zhuang, J. Wang, J. Huang, C. Wang, C. Bai, X. Zhou, Q. Li, F. Chen, H. Yu, J. Feng // *Investigational New Drugs*. – 2018. – Vol. 36. – № 2. – P. 315–322.

187. Pan L.-Q. Hetero-modification of TRAIL trimer for improved drug delivery and in vivo antitumor activities / L.-Q. Pan, W.-B. Zhao, J. Lai, D. Ding, X.-Y. Wei, Y.-Y. Li, W.-H. Liu, X.-Y. Yang, Y.-C. Xu, S.-Q. Chen // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 14872.

188. Papadopoulos K. P. Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody® targeting the DR5 receptor / K. P. Papadopoulos, R. Isaacs, S. Bilic, K. Kentsch, H. A. Huet, M. Hofmann, D. Rasco, N. Kundamal, Z. Tang, J. Cooksey, A. Mahipal // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2015. – Vol. 75. – № 5. – P. 887–895.

189. Park K.-J. Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death / K.-J. Park, S.-H. Lee, C.-H. Lee, J.-Y. Jang, J. Chung, M.-H. Kwon, Y.-S. Kim // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Vol. 382. – № 4. – P. 726–729.
190. Pehlivan K. C. CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease / K. C. Pehlivan, B. B. Duncan, D. W. Lee // *Current Hematologic Malignancy Reports*. – 2018. – Vol. 13. – № 5. – P. 396–406.
191. Pelcovits A. Acute Myeloid Leukemia: A Review / A. Pelcovits, R. Niroula // *Rhode Island Medical Journal* (2013). – 2020. – Vol. 103. – № 3. – P. 38–40.
192. Pickup M. W. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer / M. W. Pickup, J. K. Mouw, V. M. Weaver // *EMBO reports*. – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. 1243–1253.
193. Pieczykolan J. S. AD-O53.2—a novel recombinant fusion protein combining the activities of TRAIL/Apo2L and Smac/Diablo, overcomes resistance of human cancer cells to TRAIL/Apo2L / J. S. Pieczykolan, K. Kubiński, M. Masłyk, S. D. Pawlak, A. Pieczykolan, P. K. Rózga, M. Szymanik, M. Gałązka, M. Teska-Kamińska, B. Żerek, K. Bukato, K. Poleszak, A. Jaworski, W. Strożek, R. Świder, R. Zieliński // *Investigational New Drugs*. – 2014. – Vol. 32. – № 6. – P. 1155–1166.
194. Pimenta D. B. The Bone Marrow Microenvironment Mechanisms in Acute Myeloid Leukemia / D. B. Pimenta, V. A. Varela, T. S. Datoguia, V. B. Caraciolo, G. H. Lopes, W. O. Pereira // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 764698.
195. Pitti R. M. Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family / R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore, A. Ashkenazi // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 22. – P. 12687–12690.
196. Punt S. A beneficial tumor microenvironment in oropharyngeal squamous cell carcinoma is characterized by a high T cell and low IL-17+ cell frequency / S. Punt, E. A. C. Dronkers, M. J. P. Welters, R. Goedemans, S. Koljenović, E. Bloemena, P. J.

F. Snijders, A. Gorter, S. H. Van Der Burg, R. J. B. De Jong, E. S. Jordanova // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2016. – Vol. 65. – № 4. – P. 393–403.

197. Qiu Y. A novel anti-DR5 chimeric antibody and epirubicin synergistically suppress tumor growth / Y. Qiu, Z. Zhang, J. Shi, S. Liu, Y. Liu, D. Zheng // *IUBMB Life*. – 2012. – Vol. 64. – № 9. – P. 757–765.

198. Quintavalle C. Dulanermin in cancer therapy: still much to do / C. Quintavalle, G. Condorelli // *Translational Lung Cancer Research*. – 2012. – Vol. 1. – № 2. – P. 158–159.

199. Rahman M. TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype / M. Rahman, S. R. Davis, J. G. Pumphrey, J. Bao, M. M. Nau, P. S. Meltzer, S. Lipkowitz // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2009. – Vol. 113. – № 2. – P. 217–230.

200. Rahman M. Chapter 3 The TRAIL to Targeted Therapy of Breast Cancer / M. Rahman, J. G. Pumphrey, S. Lipkowitz // *Advances in Cancer Research*. – Elsevier, 2009. – Vol. 103. – P. 43–73.

201. Ralff M. D. TRAIL pathway targeting therapeutics / M. D. Ralff, W. S. El-Deiry // *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. – 2018. – Vol. 3. – № 3. – P. 197–204.

202. Rasper D. M. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex / D. M. Rasper, J. P. Vaillancourt, S. Hadano, V. M. Houtzager, I. Seiden, S. L. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B. F. Koop, E. P. Peterson, N. A. Thornberry, J. Huang, D. P. MacPherson, S. C. Black, F. Hornung, M. J. Lenardo, M. R. Hayden, S. Roy, D. W. Nicholson // *Cell Death & Differentiation*. – 1998. – Vol. 5. – № 4. – P. 271–288.

203. Ratain M. J. Phase 1, first-in-human study of TRAIL receptor agonist fusion protein ABBV-621 / M. J. Ratain, T. Doi, M. J. De Jonge, P. LoRusso, M. Dunbar, M. Chiney, M. Motwani, J. Glasgow, A. M. Petrich, D. W. Rasco, E. Calvo // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 37. – № 15_suppl. – P. 3013–3013.

204. Razeghian E. Harnessing TRAIL-Induced Apoptosis Pathway for Cancer Immunotherapy and Associated Challenges / E. Razeghian, W. Suksatan, H. Sulaiman Rahman, D. O. Bokov, W. K. Abdelbasset, A. Hassanzadeh, F. Marofi, M. Yazdanifar, M. Jarahian // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 699746.
205. Reichenberger K. J. Gene Amplification Is a Mechanism of *Six1* Overexpression in Breast Cancer / K. J. Reichenberger, R. D. Coletta, A. P. Schulte, M. Varella-Garcia, H. L. Ford // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – № 7. – P. 2668–2675.
206. Reis C. R. TRAIL-death receptor endocytosis and apoptosis are selectively regulated by dynamin-1 activation / C. R. Reis, P.-H. Chen, N. Bendris, S. L. Schmid // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 3. – P. 504–509.
207. Ritter B. Modulating inflammation for cancer therapy / B. Ritter, F. R. Greten // *Journal of Experimental Medicine*. – 2019. – Vol. 216. – № 6. – P. 1234–1243.
208. Rosenberg P. S. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia / P. S. Rosenberg, M. H. Greene, B. P. Alter // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – № 3. – P. 822–826.
209. Rubnitz J. E. Acute Myeloid Leukemia / J. E. Rubnitz, B. Gibson, F. O. Smith // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. – 2010. – Vol. 24. – № 1. – P. 35–63.
210. Safa A. R. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator / A. R. Safa // *Experimental Oncology*. – 2012. – Vol. 34. – № 3. – P. 176–184.
211. Salvesen G. S. Caspase activation: The induced-proximity model / G. S. Salvesen, V. M. Dixit // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96. – № 20. – P. 10964–10967.
212. Samuel T. Distinct BIR Domains of cIAP1 Mediate Binding to and Ubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2 and Second Mitochondrial Activator of Caspases / T. Samuel, K. Welsh, T. Lober, S. H. Togo, J. M.

Zapata, J. C. Reed // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. – № 2. – P. 1080–1090.

213. Sandoval C. Secondary acute myeloid leukemia in children previously treated with alkylating agents, intercalating topoisomerase II inhibitors, and irradiation. / C. Sandoval, C. H. Pui, L. C. Bowman, D. Heaton, C. A. Hurwitz, S. C. Raimondi, F. G. Behm, D. R. Head // *Journal of Clinical Oncology*. – 1993. – Vol. 11. – № 6. – P. 1039–1045.

214. Sastry K. S. Multiple signaling pathways converge on proapoptotic protein BAD to promote survival of melanocytes / K. S. Sastry, W. N. Ibrahim, A. I. Chouchane // *The FASEB Journal*. – 2020. – Vol. 34. – № 11. – P. 14602–14614.

215. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review) / V. Schirmacher // *International Journal of Oncology*. – 2018. – Vol. 54. – № 2. – P. 407–419.

216. Schneider P. Characterization of two receptors for TRAIL / P. Schneider, J.-L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler, J. Tschopp // *FEBS Letters*. – 1997. – Vol. 416. – № 3. – P. 329–334.

217. Schroeder B. O. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease / B. O. Schroeder, F. Bäckhed // *Nature Medicine*. – 2016. – Vol. 22. – № 10. – P. 1079–1089.

218. Seifert O. Tetravalent Antibody–scTRAIL Fusion Proteins with Improved Properties / O. Seifert, A. Plappert, S. Fellermeier, M. Siegemund, K. Pfizenmaier, R. E. Kontermann // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2014. – Vol. 13. – № 1. – P. 101–111.

219. Shalapour S. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil / S. Shalapour, M. Karin // *Journal of Clinical Investigation*. – 2015. – Vol. 125. – № 9. – P. 3347–3355.

220. Shallis R. M. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges / R. M. Shallis, R. Wang, A. Davidoff, X. Ma, A. M. Zeidan // *Blood Reviews*. – 2019. – Vol. 36. – P. 70–87.

221. Shankar E. Protein kinase C ϵ confers resistance of MCF-7 cells to TRAIL by Akt-dependent activation of Hdm2 and downregulation of p53 / E. Shankar, U. Sivaprasad, A. Basu // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27. – № 28. – P. 3957–3966.
222. Shi Y. Caspase Activation / Y. Shi // *Cell*. – 2004. – Vol. 117. – № 7. – P. 855–858.
223. Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis / Y. Shi // *Molecular Cell*. – 2002. – Vol. 9. – № 3. – P. 459–470.
224. Shirley S. Targeting c-FLIP in cancer / S. Shirley, O. Micheau // *Cancer Letters*. – 2013. – Vol. 332. – № 2. – P. 141–150.
225. Simonet W. S. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density / W. S. Simonet, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M.-S. Chang, R. Lüthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.-L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, W. J. Boyle // *Cell*. – 1997. – Vol. 89. – № 2. – P. 309–319.
226. Skelding K. A. Bone Marrow Microenvironment as a Source of New Drug Targets for the Treatment of Acute Myeloid Leukaemia / K. A. Skelding, D. L. Barry, D. Z. Theron, L. F. Lincz // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 24. – № 1. – P. 563.
227. Smyth P. FLIP(L): the pseudo-caspase / P. Smyth, T. Sessler, C. J. Scott, D. B. Longley // *The FEBS Journal*. – 2020. – Vol. 287. – № 19. – P. 4246–4260.
228. Snyder R. Leukemia and Benzene / R. Snyder // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2012. – Vol. 9. – № 8. – P. 2875–2893.
229. Socie G. Malignant Tumors Occurring after Treatment of Aplastic Anemia / G. Socie, M. Henry-Amar, A. Bacigalupo, J. Hows, A. Tichelli, P. Ljungman, S. R. McCann, N. Frickhofen, E. Van't Veer-Korthof, E. Gluckman // *New England Journal of Medicine*. – 1993. – Vol. 329. – № 16. – P. 1152–1157.

230. Son J. K. TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1 / J. K. Son, S. Varadarajan, S. B. Bratton // *Cell Death & Differentiation*. – 2010. – Vol. 17. – № 8. – P. 1288–1301.

231. Song J. J. Evidence for Two Modes of Development of Acquired Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Resistance / J. J. Song, J. Y. An, Y. T. Kwon, Y. J. Lee // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 1. – P. 319–328.

232. Song J. J. c-Cbl acts as a mediator of Src-induced activation of the PI3K-Akt signal transduction pathway during TRAIL treatment / J. J. Song, J.-H. Kim, B. K. Sun, M. A. Alcala, D. L. Bartlett, Y. J. Lee // *Cellular Signalling*. – 2010. – Vol. 22. – № 3. – P. 377–385.

233. Soria J.-C. Randomized Phase II Study of Dulanermin in Combination With Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer / J.-C. Soria, Z. Márk, P. Zatloukal, B. Szima, I. Albert, E. Juhász, J.-L. Pujol, J. Kozielski, N. Baker, D. Smethurst, Y. Hei, A. Ashkenazi, H. Stern, L. Amler, Y. Pan, F. Blackhall // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 29. – № 33. – P. 4442–4451.

234. Sorror M. L. Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia-Composite Model to Estimate Risks of Mortality / M. L. Sorror, B. E. Storer, A. T. Fathi, A. T. Gerds, B. C. Medeiros, P. Shami, A. M. Brunner, M. A. Sekeres, S. Mukherjee, E. Peña, M. Elsayy, S. Wardyn, J. Whitten, R. Moore, P. S. Becker, J. S. McCune, F. R. Appelbaum, E. H. Estey // *JAMA Oncology*. – 2017. – Vol. 3. – № 12. – P. 1675.

235. Sprick M. R. FADD/MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2 / M. R. Sprick, M. A. Weigand, E. Rieser, C. T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P. H. Krammer, H. Walczak // *Immunity*. – 2000. – Vol. 12. – № 6. – P. 599–609.

236. Srinivasula S. M. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis / S. M. Srinivasula, R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R.-A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, E. S. Alnemri // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – № 6824. – P. 112–116.

237. Subramanian A. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles / A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, J. P. Mesirov // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – Gene set enrichment analysis. – № 43. – P. 15545–15550.

238. Sun B. K. TRAIL-induced caspase/p38 activation is responsible for the increased catalytic and invasive activities of Akt / B. K. Sun, J.-H. Kim, H. N. Nguyen, S. Y. Kim, S. Oh, Y. J. Lee, J. J. Song // *International Journal of Oncology*. – 2011. – Vol. 38. – № 1. – P. 249–256.

239. Szklarczyk D. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets / D. Szklarczyk, A. L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N. T. Doncheva, J. H. Morris, P. Bork, L. J. Jensen, C. von Mering // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – STRING v11. – № D1. – P. D607–D613.

240. Tanaka H. 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1-mediated I κ B Kinase β (IKKB) Phosphorylation Activates NF- κ B Signaling / H. Tanaka, N. Fujita, T. Tsuruo // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 49. – P. 40965–40973.

241. Techasen A. Cytokines released from activated human macrophages induce epithelial mesenchymal transition markers of cholangiocarcinoma cells / A. Techasen, W. Loilome, N. Namwat, H. Dokduang, J. Jongthawin, P. Yongvanit // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. – 2012. – Vol. 13 Suppl. – P. 115–118.

242. Tenev T. The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs / T. Tenev, K. Bianchi, M. Darding, M. Broemer, C. Langlais, F. Wallberg, A. Zachariou, J. Lopez, M. MacFarlane, K. Cain, P. Meier // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 43. – № 3. – P. 432–448.

243. Thangaraju S. Therapeutic targeting of the TNF superfamily: A promising treatment for advanced endometrial adenocarcinoma / S. Thangaraju, E. Subramani, B.

Chakravarty, K. Chaudhury // *Gynecologic Oncology*. – 2012. – Vol. 127. – № 2. – P. 426–432.

244. Thomas S. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy / S. Thomas, B. A. Quinn, S. K. Das, R. Dash, L. Emdad, S. Dasgupta, X.-Y. Wang, P. Dent, J. C. Reed, M. Pellecchia, D. Sarkar, P. B. Fisher // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2013. – Vol. 17. – № 1. – P. 61–75.

245. Trauzold A. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF- κ B contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells / A. Trauzold, H. Wermann, A. Arlt, S. Schütze, H. Schäfer, S. Oestern, C. Röder, H. Ungefroren, E. Lampe, M. Heinrich, H. Walczak, H. Kalthoff // *Oncogene*. – 2001. – Vol. 20. – № 31. – P. 4258–4269.

246. Trivedi R. Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells / R. Trivedi, D. P. Mishra // *Frontiers in Oncology*. – 2015. – Vol. 5.

247. Tschopp J. Inhibition of Fas death signals by FLIPs / J. Tschopp, M. Irmeler, M. Thome // *Current Opinion in Immunology*. – 1998. – Vol. 10. – № 5. – P. 552–558.

248. Tuthill M. H. TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells / M. H. Tuthill, A. Montinaro, J. Zinngrebe, K. Prieske, P. Draber, S. Prieske, T. Newsom-Davis, S. von Karstedt, J. Graves, H. Walczak // *Oncogene*. – 2015. – Vol. 34. – № 16. – P. 2138–2144.

249. Twomey J. D. Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells / J. D. Twomey, S.-R. Kim, L. Zhao, W. P. Bozza, B. Zhang // *Drug Resistance Updates*. – 2015. – Vol. 19. – P. 13–21.

250. Vaculová A. Different modulation of TRAIL-induced apoptosis by inhibition of pro-survival pathways in TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant colon cancer cells / A. Vaculová, J. Hofmanová, K. Souček, A. Kozubík // *FEBS Letters*. – 2006. – Vol. 580. – № 28–29. – P. 6565–6569.

251. Valley C. C. Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Induces Death Receptor 5 Networks That Are Highly Organized / C. C.

Valley, A. K. Lewis, D. J. Mudaliar, J. D. Perlmutter, A. R. Braun, C. B. Karim, D. D. Thomas, J. R. Brody, J. N. Sachs // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 25. – P. 21265–21278.

252. Van Loo G. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity / G. Van Loo, M. Van Gorp, B. Depuydt, S. M. Srinivasula, I. Rodriguez, E. S. Alnemri, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, W. Declercq, P. Vandenabeele // *Cell Death & Differentiation*. – 2002. – Vol. 9. – № 1. – P. 20–26.

253. Van Schaeybroeck S. Src and ADAM-17–Mediated Shedding of Transforming Growth Factor- α Is a Mechanism of Acute Resistance to TRAIL / S. Van Schaeybroeck, D. M. Kelly, J. Kyula, S. Stokesberry, D. A. Fennell, P. G. Johnston, D. B. Longley // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 20. – P. 8312–8321.

254. Vandenabeele P. The Role of the Kinases RIP1 and RIP3 in TNF-Induced Necrosis / P. Vandenabeele, W. Declercq, F. Van Herreweghe, T. Vanden Berghe // *Science Signaling*. – 2010. – Vol. 3. – № 115.

255. Vara J. Á. F. PI3K/Akt signalling pathway and cancer / J. Á. F. Vara, E. Casado, J. De Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta, M. González-Barón // *Cancer Treatment Reviews*. – 2004. – Vol. 30. – № 2. – P. 193–204.

256. Varfolomeev E. Molecular Determinants of Kinase Pathway Activation by Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand / E. Varfolomeev, H. Maecker, D. Sharp, D. Lawrence, M. Renz, D. Vucic, A. Ashkenazi // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 49. – P. 40599–40608.

257. Varfolomeev E. The Inhibitor of Apoptosis Protein Fusion c-IAP2·MALT1 Stimulates NF- κ B Activation Independently of TRAF1 AND TRAF2 / E. Varfolomeev, S. M. Wayson, V. M. Dixit, W. J. Fairbrother, D. Vucic // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. – № 39. – P. 29022–29029.

258. Vasan N. A view on drug resistance in cancer / N. Vasan, J. Baselga, D. M. Hyman // *Nature*. – 2019. – Vol. 575. – № 7782. – P. 299–309.

259. Ventura J.-J. Chemical Genetic Analysis of the Time Course of Signal Transduction by JNK / J.-J. Ventura, A. Hübner, C. Zhang, R. A. Flavell, K. M. Shokat, R. J. Davis // *Molecular Cell*. – 2006. – Vol. 21. – № 5. – P. 701–710.

260. Vilimanovich U. TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2 / U. Vilimanovich, V. Bumbasirevic // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65. – № 5. – P. 814–826.

261. Vonk C. M. Molecular Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia / C. M. Vonk, A. S. A. Al Hinai, D. Hanekamp, P. J. M. Valk // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 21. – P. 5431.

262. Wagner K. W. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL / K. W. Wagner, E. A. Punnoose, T. Januario, D. A. Lawrence, R. M. Pitti, K. Lancaster, D. Lee, M. Von Goetz, S. F. Yee, K. Totpal, L. Huw, V. Katta, G. Cavet, S. G. Hymowitz, L. Amler, A. Ashkenazi // *Nature Medicine*. – 2007. – Vol. 13. – № 9. – P. 1070–1077.

263. Wajant. Molecular Mode of Action of TRAIL Receptor Agonists—Common Principles and Their Translational Exploitation / Wajant // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 7. – P. 954.

264. Walczak H. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo / H. Walczak, R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. L. Schuh, D. H. Lynch // *Nature Medicine*. – 1999. – Vol. 5. – № 2. – P. 157–163.

265. Wang D. Activation of Nuclear Factor- κ B-dependent Transcription by Tumor Necrosis Factor- α Is Mediated through Phosphorylation of RelA/p65 on Serine 529 / D. Wang, A. S. Baldwin // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 45. – P. 29411–29416.

266. Wang Q. Isolation and Molecular Characterization of the 5'-Upstream Region of the Human TRAIL Gene / Q. Wang, Y. Ji, X. Wang, B. M. Evers // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2000. – Vol. 276. – № 2. – P. 466–471.

267. Wang T. T. Y. Coordinated regulation of two TRAIL-R2/KILLER/DR5 mRNA isoforms by DNA damaging agents, serum and 17 β -estradiol in human breast cancer cells / T. T. Y. Wang, J. Jeng // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2000. – Vol. 61. – № 1. – P. 87–96.

268. Wang Z. A novel capsid-modified oncolytic recombinant adenovirus type 5 for tumor-targeting gene therapy by intravenous route / Z. Wang, B. Yu, B. Wang, J. Yan, X. Feng, Z. Wang, L. Wang, H. Zhang, H. Wu, J. Wu, W. Kong, X. Yu // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 30. – P. 47287–47301.

269. Weldon C. B. Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling / C. B. Weldon, A. P. Parker, D. Patten, S. Elliott, Y. Tang, D. E. Frigo, C. M. Dugan, E. L. Coakley, N. N. Butler, J. L. Clayton, J. Alam, T. J. Curiel, B. S. Beckman, B. M. Jaffe, M. E. Burow // *International Journal of Oncology*. – 2004. – Vol. 24. – № 6. – P. 1473–1480.

270. Werneburg N. W. Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Activates a Lysosomal Pathway of Apoptosis That Is Regulated by Bcl-2 Proteins / N. W. Werneburg, M. E. Guicciardi, S. F. Bronk, S. H. Kaufmann, G. J. Gores // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 39. – P. 28960–28970.

271. Wiley S. R. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis / S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C.-P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, R. G. Goodwin // *Immunity*. – 1995. – Vol. 3. – № 6. – P. 673–682.

272. Willis S. N. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-x_L, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins / S. N. Willis, L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams, D. C. S. Huang // *Genes & Development*. – 2005. – Vol. 19. – № 11. – P. 1294–1305.

273. Witz I. P. The Tumor Microenvironment: The Making of a Paradigm / I. P. Witz // *Cancer Microenvironment*. – 2009. – Vol. 2. – № S1. – P. 9–17.

274. Wong R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment / R. S. Wong // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2011. – Vol. 30. – № 1. – P. 87.

275. Wong S. H. M. The TRAIL to cancer therapy: Hindrances and potential solutions / S. H. M. Wong, W. Y. Kong, C.-M. Fang, H.-S. Loh, L.-H. Chuah, S. Abdullah, S. C. Ngai // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2019. – Vol. 143. – P. 81–94.

276. Wu G. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO / G. Wu, J. Chai, T. L. Suber, J.-W. Wu, C. Du, X. Wang, Y. Shi // *Nature*. – 2000. – Vol. 408. – № 6815. – P. 1008–1012.

277. Xu J. Activation of the Akt Survival Pathway Contributes to TRAIL Resistance in Cancer Cells / J. Xu, J.-Y. Zhou, W.-Z. Wei, G. S. Wu // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5. – № 4. – P. e10226.

278. Xue Y. Acquired amegakaryocytic thrombocytopenic purpura with a Philadelphia chromosome / Y. Xue, R. Zhang, Y. Guo, J. Gu, B. Lin // *Cancer Genetics and Cytogenetics*. – 1993. – Vol. 69. – № 1. – P. 51–56.

279. Yagolovich A. V. DR5-Selective TRAIL Variant DR5-B Functionalized with Tumor-Penetrating iRGD Peptide for Enhanced Antitumor Activity against Glioblastoma / A. V. Yagolovich, A. A. Isakova, A. A. Artykov, Y. V. Vorontsova, D. V. Mazur, N. V. Antipova, M. S. Pavlyukov, M. I. Shakhparonov, A. M. Gileva, E. A. Markvicheva, E. A. Plotnikova, A. A. Pankratov, M. P. Kirpichnikov, M. E. Gasparian, D. A. Dolgikh // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 20. – P. 12687.

280. Yeh W.-C. Requirement for Casper (c-FLIP) in Regulation of Death Receptor-Induced Apoptosis and Embryonic Development / W.-C. Yeh, A. Itie, A. J. Elia, M. Ng, H.-B. Shu, A. Wakeham, C. Mirtsos, N. Suzuki, M. Bonnard, D. V. Goeddel, T. W. Mak // *Immunity*. – 2000. – Vol. 12. – № 6. – P. 633–642.

281. Yin S. N. An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. Benzene Study Group. / S. N. Yin, R. B. Hayes, M. S. Linet, G. L. Li, M. Dosemeci, L. B. Travis, Z. N. Zhang, D. G. Li, W. H. Chow, S. Wacholder, W. J.

Blot // *Environmental Health Perspectives*. – 1996a. – Vol. 104. – № suppl 6. – P. 1339–1341.

282. Yin S.-N. A cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China: Overall results / S.-N. Yin, R. B. Hayes, M. S. Linet, G.-L. Li, M. Dosemeci, L. B. Travis, C.-Y. Li, Z.-N. Zhang, D.-G. Li, W.-H. Chow, S. Wacholder, Y.-Z. Wang, Z.-L. Jiang, T.-R. Dai, W.-Y. Zhang, X.-J. Chao, P.-Z. Ye, Q.-R. Kou, X.-C. Zhang, X.-F. Lin, J.-F. Meng, C.-Y. Ding, J.-S. Zho, W. J. Blot // *American Journal of Industrial Medicine*. – 1996b. – Vol. 29. – № 3. – P. 227–235.

283. Yokokura S. Confluence-dependent resistance to cisplatin in lung cancer cells is regulated by transforming growth factor-beta / S. Yokokura, N. Kanaji, A. Tadokoro, S. Yokokura, N. Kadowaki, S. Bandoh // *Experimental Lung Research*. – 2016. – Vol. 42. – № 4. – P. 175–181.

284. Younes A. A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma / A. Younes, J. M. Vose, A. D. Zelenetz, M. R. Smith, H. A. Burris, S. M. Ansell, J. Klein, W. Halpern, R. Miceli, E. Kumm, N. L. Fox, M. S. Czuczman // *British Journal of Cancer*. – 2010. – Vol. 103. – № 12. – P. 1783–1787.

285. Yu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study / H. Yu, L. Lin, Z. Zhang, H. Zhang, H. Hu // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. 209.

286. Zauli G. PI-3K/Akt and NF- κ B pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment / G. Zauli, S. Sancilio, A. Cataldi, N. Sabatini, D. Bosco, R. Di Pietro // *Journal of Cellular Physiology*. – 2005. – Vol. 202. – № 3. – P. 900–911.

287. Zhang J. Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia / J. Zhang, Y. Gu, B. Chen // *OncoTargets and Therapy*. – 2019. – Vol. 12. – P. 1937–1945.

288. Zhang L. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer / L. Zhang, B. Fang // *Cancer Gene Therapy*. – 2005. – Vol. 12. – № 3. – P. 228–237.

289. Zhang L. Lack of p38 MAP Kinase Activation in TRAIL-Resistant Cells is Not Related to the Resistance to TRAIL-Mediated Cell Death / L. Zhang, H. Zhu, J. J.

Davis, D. Jacob, S. Wu, F. Teraishi, A. Gutierrez, Y. Wang, B. Fang // *Cancer Biology & Therapy*. – 2004. – Vol. 3. – № 3. – P. 296–301.

290. Zhang N. The Long Isoform of Cellular FLIP Is Essential for T Lymphocyte Proliferation through an NF- κ B-Independent Pathway / N. Zhang, K. Hopkins, Y.-W. He // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – № 8. – P. 5506–5511.

291. Zhang X. D. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria / X. D. Zhang, J. M. Borrow, X. Y. Zhang, T. Nguyen, P. Hersey // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22. – № 19. – P. 2869–2881.

292. Zhang X. H.-F. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent Survival Signals / X. H.-F. Zhang, Q. Wang, W. Gerald, C. A. Hudis, L. Norton, M. Smid, J. A. Foekens, J. Massagué // *Cancer Cell*. – 2009. – Vol. 16. – № 1. – P. 67–78.

293. Zhang Y. TRAIL Resistance of Breast Cancer Cells Is Associated with Constitutive Endocytosis of Death Receptors 4 and 5 / Y. Zhang, B. Zhang // *Molecular Cancer Research*. – 2008. – Vol. 6. – № 12. – P. 1861–1871.

294. Zhang Y. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma / Y. Zhang, J. Zhu, Y. Tang, F. Li, H. Zhou, B. Peng, C. Zhou, R. Fu // *Diagnostic Pathology*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. 49.

295. Zheng L. Progress on the Mechanism for Aspirin's Anti-tumor Effects / L. Zheng, W. Lv, Y. Zhou, X. Lin, J. Yao // *Current Drug Targets*. – 2020. – Vol. 22. – № 1. – P. 105–111.

296. Zhou Y. Is there a need for morphologic exam to detect relapse in AML if multi-parameter flow cytometry is employed? / Y. Zhou, B. L. Wood, R. B. Walter, P. S. Becker, M.-E. Percival, M. Bar, C. Shaw, K. Gardner, P. Hendrie, J. Abkowitz, F. R. Appelbaum, E. Estey // *Leukemia*. – 2017. – Vol. 31. – № 11. – P. 2536–2537.